

PERFIL MUTACIONAL DE MELANOMAS CUTÂNEOS E IMPACTO NO PADRÃO GLOBAL DE METILAÇÃO DE DNA

DIMITRIUS TANSINI PRANIO

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Mestre
em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Ana Cristina Victorino Krepischi

São Paulo

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Pranio, Dimitrius Tansini

Perfil mutacional de melanomas cutâneos e impacto no padrão global de metilação de DNA / Dimitrius Tansini Pranio - São Paulo, 2015.

158p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Ana Cristina Victorino Krepschi

Descritores: 1. MELANOMA/genética. 2. METILAÇÃO DE DNA/genética. 3. MUTAÇÃO/genética. 4. EXPRESSÃO GÊNICA.

RESUMO

Pramio DT. **Perfil mutacional de melanomas cutâneos e impacto no padrão global de metilação de DNA**. São Paulo; 2015. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: O melanoma cutâneo é uma neoplasia rara que, no entanto, apresenta altas taxas de mortalidade se o diagnóstico for tardio. Diversas mutações causais que conferem vantagem seletiva às células tumorais são descritas no melanoma cutâneo, assim como ocorrem diversas mutações no padrão epigenético, em especial afetando a metilação do DNA. Os mecanismos epigenéticos atuam na regulação da expressão dos genes de eucariontes e com frequência encontram-se alterados no câncer. Atualmente pouco é conhecido acerca dos padrões globais de metilação do DNA em melanomas cutâneos e de eventual associação com mutações específicas.

Objetivos: Estudo do padrão global de metilação do DNA (metiloma) de um grupo de melanomas cutâneos visando correlacionar o perfil epigenômico com (a) alterações genéticas em *BRAF*, *NRAS*, *KIT* e *TERT* (mutações de ponto), *CDKN2A*, *CDKN2B* e *CDK4* (deleções/duplicações genômicas) e (b) parâmetros clínicos e patológicos, na busca de possíveis assinaturas epigenéticas para as variáveis analisadas. **Material e métodos:** O grupo de tumores foi composto por vinte melanomas primários e sete tecidos metastáticos pareados. O screening de mutações causais no melanoma cutâneo foi feito por sequenciamento Sanger de hotspots conhecidos dos genes *BRAF*, *NRAS*, *KIT* e *TERT*; multiplex-ligation probe amplification (MLPA) para alterações de número de cópias dos genes *CDKN2A*, *CDKN2B* e *CDK4*; pirosequenciamento para análise de metilação de promotor de *CDKN2A* e *LINE-1*. O estudo de metiloma foi realizado com a plataforma HM450K Illumina, utilizando a análise de metilação diferencial proposta na pipeline ChAMP e análise de metilação de ilha CpG em promotor desenvolvida in house. **Resultados:** O estudo de alterações causais revelou frequências de mutação similares à literatura: *CDKN2A* (60%), *TERT*-

promotor (60%), *BRAF* (35%), *NRAS* (20%) e *KIT* (5%). Os tecidos metastáticos apresentaram um perfil mutacional semelhante aos melanomas primários pareados. Na investigação do elemento repetitivo *LINE-1*, cinco tumores primários apresentaram mediana dos níveis de metilação < 50% (hipometilação), correspondendo a melanomas portadores de alterações em *CDKN2A*, quatro deles com estadiamento pT4. A análise de padrão de metilação de DNA do grupo de melanomas primários em comparação às culturas de melanócitos normais (controle) revelou um grande número de eventos de hipermetilação, especialmente de sítios CpG em regiões intergênicas e no corpo dos genes. Com relação às regiões diferencialmente metiladas (DMRs), 50% das DMRs hipometiladas em tumores primários apresentaram elementos de transposição ou RNAs longos não-codificadores (lncRNAs) associados. A comparação entre tumores primários com diferentes características clínico-patológicas e perfis mutacionais distintos revelou padrões globais de metilação do DNA que variaram de acordo com a característica analisada: tumores portadores de mutação em *NRAS*, ou do subtipo histológico acral, ou com infiltrado inflamatório, exibiram um grande número de promotores hipermetilados; tumores mutados em *BRAF* ou *TERT* e pacientes que desenvolveram metástase linfonodal apresentaram grande número de promotores hipometilados; tumores com mutações em *CDKN2A*, ou com estadiamento pT4, ou com ulceração apresentaram eventos equivalentes de hipo e hipermetilação em promotores gênicos. Seis genes com padrão de metilação diferencial em um dos contextos foram selecionados a partir das análises acima descritas para mensurar os níveis de expressão gênica. Todos os seis genes avaliados apresentaram correlação negativa entre o nível de metilação na região promotora e a expressão relativa, conforme esperado em um modelo no qual o aumento da metilação de promotor atuaria reprimindo a transcrição e vice-versa. Destes seis genes, três exibiram significância estatística no resultado de correlação negativa: *HIST1H1D*, *PAX8-AS1* e *SSPN*. Dois dos genes avaliados apresentaram diferença de expressão com significância estatística entre os grupos comparados: *HIST1H1D*, mais expresso em tumores mutados em

BRAF, e *PAX8-AS1*, mais expresso em pacientes que não desenvolveram metástase linfonodal. Em uma análise final, obtivemos uma assinatura epigenética constituída por 516 DMRs, correspondente a 516 genes, específica para o grupo de melanomas primários, independentemente do perfil de mutações genéticas detectadas nos tumores. **Conclusões:** O perfil global de metilação do DNA em melanomas cutâneos está correlacionado com diferentes características clínicas, patológicas e mutacionais, com níveis de confiança variáveis. Validamos para seis genes testados um padrão de correlação negativa entre a quantidade de metilação na região promotora e o nível de expressão gênica, dados que indicam que, nestes casos, a metilação exerceria papel de controle da regulação da expressão gênica. Nesta análise integrando metilação do DNA e expressão gênica, destacamos dois genes, *HIST1H1D* (super-expresso em tumores mutados em *BRAF*) e *PAX8-AS1* (regulado negativamente em pacientes com metástase linfonodal), que merecem investigações posteriores. Nosso estudo também revelou que a hipometilação do elemento repetitivo *LINE-1* pode ser um marcador para melanomas cutâneos que apresentam alterações em *CDKN2A* e/ou com estágios mais avançados da doença. Entretanto, o achado mais consistente nos melanomas primários foi a detecção de um conjunto comum de genes que exibem alteração nos níveis de metilação na região promotora, diferenciando-os do padrão de seus precursores celulares normais, os melanócitos. Alterações epigenéticas neste conjunto de genes podem revelar vias importantes para a melanomagenese.

SUMMARY

Pramio DT. **[Mutational profile of cutaneous melanomas and impact in the overall DNA methylation pattern]**. São Paulo, 2015. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introduction: Cutaneous melanoma (CM) is a rare neoplasia, however presents a very high mortality rate when the disease is diagnosed later. Several driver mutations are known to confer selective advantages for the tumor cells in CM. Additionally, epigenetic alterations, especially those affecting DNA methylation, have been reported. DNA methylation is an epigenetic mechanism which is responsible for controlling the expression levels of a great number of human genes, and it is frequently altered in cancer cells. Nowadays, the overall DNA methylation pattern of CMs is poorly understood as well as its possible association with specific driver mutations. **Objectives:** Study the overall DNA methylation pattern (methylome) of a cutaneous melanoma group, aiming to correlate the epigenomic profile with (a) genetic alterations in *BRAF*, *NRAS*, *KIT* and *TERT* (point mutations); *CDKN2A*, *CDKN2B* and *CDK4* (genomic deletions/duplications) and (b) clinical and pathological parameters, in the search for epigenetic signatures for each of the analysed variables. **Material and methods:** The group of CMs was composed by twenty primary tissues and seven paired metastatic tissues. The screening of driver mutations was performed through sanger sequencing of known hotspots of the *BRAF*, *NRAS*, *KIT* and *TERT* genes; copy number alterations of *CDKN2A*, *CDKN2B* and *CDK4* were investigated by multiplex-ligation probe amplification (MLPA); pyrosequencing was done for the study of methylation of the *CDKN2A* promoter and *LINE-1*. The methylome data was obtained through HM450K Illumina platform (methylation microarrays), and analysis was performed using two different approaches: differential methylation analysis as proposed by the ChAMP pipeline and with an in house pipeline for

differential methylation analysis of genic promoters. **Results:** The study of driver alterations of the primary CMs revealed a frequency of driver alterations similar to literature: *CDKN2A* (60%), *TERT* promoter (60%), *BRAF* (35%), *NRAS* (20%), *KIT* (5%). The seven cases of paired metastatic tissues exhibited mutational profile almost identical to the matched primary tumors. The investigation of the *LINE-1* repetitive element revealed five tumors presenting median values of methylation < 50% (considered hypomethylation), all of them CMs harboring *CDKN2A* alterations, four with pT4 staging. The analysis of the global DNA methylation pattern comparing primary tumors and normal melanocytes cultures (controls) revealed a great number of hypermethylation events in the tumors, particularly in CpG sites located in intergenic regions and gene bodies. We annotated the hypomethylated differentially methylated regions (DMRs) in this comparison, and found that 50% of them presented co-localization in the genome to transposition elements or lncRNAs. The comparison between primary tumors with distinct clinical, pathological and mutational profiles revealed different global DNA methylation patterns in association with some of the analysed characteristics. Prevalence of promoter hypermethylation events were detected in *NRAS* mutated tumors, acral subtype melanomas, and tumors with inflammatory infiltrate; tumors harboring *BRAF* and/or *TERT* mutations, and patients that developed lymph node metastasis displayed a great number of promoter hypomethylation; *CDKN2A* mutated tumors, pT4 staging tumors, or ulcerated tumors displayed an equal number of hypo and hypermethylation events in gene promoters. We selected six genes with a differential methylation pattern in one of the contexts investigated for measuring their RNA expression levels. All investigated genes presented a negative correlation between promoter methylation level and relative expression, as one would expect in a regulation model in which the gain of promoter methylation can result in transcriptional repression, or vice-versa. However, only three genes exhibited negative correlation with statistical significance: *HIST1H1D*, *PAX8-AS1* and *SSPN*. Among these three genes, two of them presented statistically significant differences in their expression

level between the compared groups: *HIST1H1D* was found to be over-expressed in tumors with *BRAF* mutations; and *PAX8-AS1* was down-regulated in patients that did developed lymph node metastasis. We also obtained an epigenomic signature composed by 516 DMRs, representative of 516 genes, that was specific for the group of primary CMs, regardless of their mutational background. **Conclusions:** The overall DNA methylation pattern of CMs can be related to clinical, pathological and mutational features, with varying levels of confidence. We validated a negative correlation pattern between promoter methylation and transcriptional activity for six genes, indicating that, in theses cases, methylation exerts a regulatory role in the gene expression. In this analysis integrating methylation and genic expression, two genes, namely *HIST1H1D* (over-expredssed in tumors with *BRAF* mutations) and *PAX8-AS1* (down-regulated inpatients with lymph node metastasis), were highlighted, deserving further investigation. Our study also revealed that hypomethylation of the *LINE-1* sequence could be marker for CMs harboring *CDKN2A* alterations and/oradvanced stages.However, the most consistent finding was the detection of a panel of genes that exhibited altered methylation level at promoter regionsin primary CMs when compared to normal melanocytes. Epigenetic alterations in these genes may reveal important pathways linked to melanomagenesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ilustração das diretrizes ABCD para identificação de melanomas.....	6
Figura 2	Curva de sobrevivência de grupo de pacientes afetados por melanoma cutâneo estratificados de acordo com o estadiamento patológico.....	10
Figura 3	Ilustração esquemática mostrando as proteínas c-KIT, RAS e BRAF constituindo as vias BRAF/MEK/ERK e PI3K/AKT, relacionadas com o controle do ciclo celular.....	17
Figura 4	Exemplo de relatório gerado pelo software Coffalyser para uma amostra analisada.....	40
Figura 5	Mecanismos de hibridização e detecção de sinal dos ensaios de metilação <i>Infinium I</i> e <i>II</i> utilizados na plataforma HM450K.....	42
Figura 6	- Dois tipos diferentes de sondas contidas na plataforma HM450K (<i>Infinium I</i> e <i>Infinium II</i>), que geram uma distribuição distinta de valores de metilação (β).....	44
Figura 7	Visão geral das etapas da pipeline ChAMP, com a qual se realiza análise de metilação diferencial para a identificação de <i>Methylation variable positions (MVPs)</i> e <i>Differentially methylated regions (DMRs)</i> entre grupos.....	47
Figura 8	Determinando uma região diferencialmente metilada (Differentially Methylated Region-DMR) utilizando a pipeline CHAMP.....	48

Figura 9	Visão geral das etapas da pipeline desenvolvida in house para análise de metilação diferencial de promotores gênicos individuais entre diferentes grupos.....	51
Figura 10	Imagem do software geNorm mostrando o cálculo da estabilidade dos genes endógenos.....	57
Figura 11	Alinhamento dos sequenciamentos do éxon 15 do gene <i>BRAF</i> com a sequência de referência RefSeq Accession number NM_004333.4 , utilizando o software CLC genomics workbench.	60
Figura 12	Alinhamento dos sequenciamentos do éxon 2 do gene <i>NRAS</i> com a sequência de referência RefSeq Accession number NM_002524.4 , utilizando o software CLC genomics workbench.	61
Figura 13	Alinhamento dos sequenciamentos do gene <i>KIT</i> (éxon 13) com a sequência de referência a RefSeq Accession number NM_000222.2, utilizando o software CLC genomics workbench.	62
Figura 14	Alinhamento dos sequenciamentos do gene <i>KIT</i> (éxon 11) com a sequência de referência RefSeq Accession number NM_000222.2, utilizando o software CLC genomics workbench.....	63
Figura 15	Alinhamento dos sequenciamentos da região promotora do gene <i>TERT</i> com a sequência de referência RefSeq Accession number NM_198253.2, utilizando o software CLC genomics workbench.....	64
Figura 16	Gráficos do número relativo de cópias das regiões genômicas investigadas para a presença de microdeleções em tumores primários.....	67
Figura 17	Espectro de mutações <i>drivers</i> nos melanomas cutâneos primários investigados.....	69

Figura 18	Espectro de mutações <i>drivers</i> nos melanomas primários e suas metástases pareadas.....	71
Figura 19	Distribuição dos níveis de metilação do elemento repetitivo LINE-1 de acordo com características clínico-patológicas dos melanomas cutâneos.....	73
Figura 20	Padrão de 174 DMRs identificadas entre melanomas primários e culturas primárias de melanócitos-controle e respectivos contextos genômicos e genes afetados.....	76
Figura 21	Panorama de alterações genéticas em 477 melanomas cutâneos do <i>The Cancer Genome Atlas</i> afetando 19 genes associados a regiões intergênicas hipometiladas associadas a elementos de transposição.....	79
Figura 22	Perfil de elementos genômicos e epigenômicos associados às DMRs hipometiladas em melanomas cutâneos primários...	80
Figura 23	Panorama de mutações genéticas em 419 melanomas cutâneos do <i>The Cancer Genome Atlas</i> afetando os 25 genes candidatos selecionados em nosso estudo por apresentarem metilação diferencial entre melanomas primários e cultura de melanócitos primários.....	84
Figura 24	Gráfico de escala multidimensional, caracterizando cada amostra de acordo com as 1000 sondas com valores de β mais variáveis na comparação entre tumores primários e metástases.....	85
Figura 25	Padrão de 16 DMRs identificadas entre melanomas primários que desenvolveram ou não metástase à distância.....	88

Figura 26	Padrão de metilação do DNA em sítios CpG mapeados na região promotora do gene <i>SSPN</i> em melanomas primários portadores ou não de mutação no promotor do gene <i>TERT</i>	96
Figura 27	Gráfico de correlação entre a expressão relativa do gene <i>HIST1H1D</i> e os níveis de metilação detectados em sua região promotora.....	98
Figura 28	Gráfico de correlação entre a expressão relativa do gene <i>HIST1H3H</i> e os níveis de metilação detectados em sua região promotora.....	99
Figura 29	Gráfico de correlação entre a expressão relativa do gene <i>HIST1H4D</i> e os níveis de metilação detectados em sua região promotora.....	100
Figura 30	Gráfico de correlação entre a expressão relativa do gene <i>HIST1H4F</i> e os níveis de metilação detectados em sua região promotora.....	101
Figura 31	Gráfico de correlação entre a expressão relativa do gene <i>PAX8-AS1</i> e os níveis de metilação detectados em sua região promotora.....	102
Figura 32	Gráfico de correlação entre a expressão relativa do gene <i>SSPN</i> e os níveis de metilação detectados em sua região promotora	103
Figura 33	Diferença de expressão relativa dos genes candidatos selecionados por diferenças de metilação entre grupos com diferentes características clínico-patológicas ou mutacionais..	104

Figura 34	Intersecção realizada entre os grupos de genes obtidos a partir de diferentes análises de metilação diferencial entre subgrupos portadores de mutações <i>driver</i> , com o intuito de obter uma assinatura específica de genes diferencialmente metilados.....	107
Figura 35	Obtenção de DMRs exclusivas da via MAP quinase.....	109
Figura 36	Obtenção de DMRs constitutivas de melanomas cutâneos.....	111
Figura 37	Testando a hipótese de assinatura de DMRs exclusiva de melanomas com mutação na via MAP-quinase.....	112
Figura 38	A alteração c.1799T>A é um hot spot no gene BRAF em melanoma cutâneo e outros tipos de câncer.....	115
Figura 39	Panorama de alterações genéticas em 477 melanomas cutâneos do <i>The Cancer Genome Atlas</i> afetando genes relacionados com tumores que desenvolveram metástase linfonodal.....	133
Figura 40	Perfil de metilação do DNA da região genômica 2q13 visualizada através do navegador <i>UCSC genome browser</i> , na qual estão localizados os genes <i>PAX8</i> e <i>PAX8-AS1</i>	134
Figura 41	Panorama de alterações genéticas em 477 melanomas cutâneos do <i>The Cancer Genome Atlas</i> afetando o gene <i>HIST1H1D</i> , hipometilado em tumores que apresentam mutações em <i>BRAF</i>	136

LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro 1	Estadiamento patológico para pacientes com melanoma cutâneo, de acordo com o sistema TNM.....	9
Quadro 2	Características clínicas dos pacientes e anatomopatológicas dos melanomas cutâneos primários estudados.....	34
Quadro 3	Mutações gênicas investigadas por sequenciamento capilar...	37
Quadro 4	Genes selecionados para análise dos níveis de expressão do RNA mensageiro: símbolo oficial, sequências dos pares de primers e localização cromossômica.....	54
Quadro 5	Genes presentes nas DMRs constitutivas da via MAP quinase.....	109
Quadro 6	Enriquecimento de processos biológicos do grupo de genes associados às DMRs constitutivas para melanomas cutâneos.	113
Tabela 1	Mediana do nível de metilação (%) de 7 CpGs representativos do gene CDKN2A nas amostras investigadas.	68
Tabela 2	Mediana da porcentagem de metilação de 4 CpGs representativos do elemento repetitivo LINE-1 nas amostras investigadas.....	72
Tabela 3	Vinte e dois genes com DMRs hipermetiladas em melanomas primários, quando comparados com melanócitos normais.....	81
Tabela 4	Três genes com DMRs hipometiladas em melanomas primários quando comparados com melanócitos normais.....	82

Tabela 5	Número de regiões diferencialmente metiladas (DMRs) em promotores gênicos entre subgrupos de melanomas primários constituídos de acordo com a presença ou ausência de uma mutação driver específica (genes BRAF, NRAS, KIT, CDKN2A e TERT).....	91
Tabela 6	Número de regiões diferencialmente metiladas (DMRs) em promotores gênicos entre subgrupos de melanomas primários constituídos de acordo com características clínicas e patológicas.....	93
Tabela 7	Análise de enriquecimento de processos biológicos utilizando o grupo de genes associado às DMRs exibindo $\Delta\beta > 10\%$ obtidas na comparação de grupos de melanomas classificados de acordo com características clínicas e patológicas.....	94
Tabela 8	Genes selecionados para análise da expressão de Mrna.	97
Tabela 9	Número de regiões diferencialmente metiladas (DMRs) em promotores gênicos entre melanomas primários agrupados de acordo com presença de mutações drivers e melanócitos controle.....	105
Tabela 10	Número de regiões diferencialmente metiladas (DMRs) entre melanomas primários com e sem mutações na via MAP-quinase	106

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

3'UTR	<i>3' untranslated region</i>
5'UTR	<i>5' untranslated region</i>
ACTB	actin, beta
BRAF	B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase
CDK4	cyclin-dependent kinase 4
CDKN1B	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)</i>
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CMYA5	cardiomyopathy associated 5
COL11A1	collagen, type XI, alpha 1
COL1A2	collagen, type I, alpha 2
CT	<i>Threshold cycle</i>
DAPK	<i>death-associated protein kinase 1</i>
DCC	DCC netrin 1 receptor
DMR	<i>differentially methylated region</i>
EMR3	egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 3
EPHA5	EPH receptor A5
FCHSD1	FCH and double SH3 domains 1
GALNT7	<i>polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 7</i>
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GATA4	<i>GATA binding protein 4</i>
GP1BB	glycoprotein Ib (platelet), beta polypeptide
HIST1H1D	histone cluster 1, H1d
HIST1H3H	histone cluster 1, H3h
HIST1H4D	histone cluster 1, H4d
HIST1H4f	histone cluster 1, H4f
HM450K	Illumina Infinium HD 450K Methylation Assay
HORMAD2	HORMA domain containing 2
HOXA9	homeobox A9
HPRT1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
HRAS	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
KIT	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
KRAS	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

lncRNA	long non-coding RNA
LRRC73	leucine rich repeat containing 73
MAPK	proteína quinases ativadas por mitógenos
MC1R	melanocortin 1 receptor
MGMT	<i>O-6-methylguanine-DNA methyltransferase</i>
miRNA	<i>micro RNA</i>
miRNAs	microRNAs
MITF	microphthalmia-associated transcription factor
MITF	microphthalmia-associated transcription factor
MMMP	Melanoma Molecular Map Project
MMP14	matrix metalloproteinase 14
mRNA	RNA mensageiro
NRAS	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
PAX8	paired box 8
PAX8-AS1	PAX8 antisense RNA 1
PTEN	phosphatase and tensin homolog
RARβ2	retinoic acid receptor, beta 2
RASSF1A	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1
RB1	retinoblastoma 1
REC8	REC8 meiotic recombination protein
SENP6	SUMO1/sentrin specific peptidase 6
SETDB1	SET domain, bifurcated 1
SOCS1	<i>suppressor of cytokine signaling 1</i>
SSPN	sarcospan
TERT	telomerase reverse transcriptase
TFPI2	<i>tissue factor pathway inhibitor 2</i>
TP53	tumor protein p53
TSS1500	1500 nucleotídeos <i>upstream</i> do sítio de início de transcrição
TSS200	200 nucleotídeos <i>upstream</i> do sítio de início de transcrição
WIF1	<i>WNT inhibitory factor 1</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Melanoma cutâneo – epidemiologia e aspectos Clínicos	1
1.1.1	Epidemiologia do melanoma cutâneo.....	2
1.1.2	Fatores de risco.....	3
1.1.3	Diagnóstico e subtipos de melanoma.....	5
1.1.4	Fatores prognósticos e estadiamento do melanoma cutâneo	8
1.2	Genética do melanoma cutâneo.....	12
1.3	Mecanismos epigenéticos no melanoma cutâneo	20
1.3.1	Metilação do DNA no melanoma cutâneo	25
2	OBJETIVOS	30
2.1	Objetivo geral	30
2.2	Objetivos específicos.....	30
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1	Crerérios de inclusão	32
3.2	Crerérios de exclusão	32
3.3	Métodos.....	35
3.3.1	Extração de DNA e RNA genômicos	35
3.3.2	Pesquisa de mutaões de ponto nos genes NRAS, BRAF, KIT TERT por sequenciamento capilar	36
3.3.3	Pesquisa de deleões/duplicaões genômicas nos genes CDKN2A, CDKN2B e CDK4 por MLPA	38
3.3.4	Estudo de Metiloma utilizando a plataforma Infinium HD 450K Methylation Assay (HM450K).....	41
3.3.5	Análise de metilaão diferencial utilizando dados derivados de experimentos HM450K	44
3.3.6	Análise de metilaão de DNA por pirosequenciamento.....	52

3.3.7	Análise de expressão de genes candidatos diferencialmente metilados entre grupos	53
4	RESULTADOS	59
4.1	Investigação de alterações causais relevantes no melanoma cutâneo	59
4.1.1	Mutações de ponto nos genes BRAF, NRAS, KIT e TERT	59
4.1.2	Deleções genômicas de CDKN2A.....	65
4.1.3	Inativação do gene CDKN2A por metilação de promotor	67
4.1.4	Sumário da investigação de alterações genéticas e epigenéticas reconhecidamente causais no melanoma cutâneo.....	68
4.2	Avaliação dos níveis de metilação do elemento repetitivo line-1	72
4.3	Perfil global de metilação de dna no melanoma cutâneo	74
4.3.1	Análise de metilação diferencial entre melanomas primários e melanócitos de indivíduos controle utilizando a pipeline ChAMP	74
4.3.2	Análise de metilação diferencial entre melanomas primários e metástases utilizando a pipeline ChAMP.....	85
4.3.3	Análise de metilação diferencial entre melanomas primários portadores de diferentes mutações drivers e de acordo com características clinico-patológicas	86
4.3.4	Análise de metilação diferencial utilizando uma pipeline customizada	89
5	DISCUSSÃO	114
5.1	Investigação de alterações causais relevantes no melanoma cutâneo .	114
5.2	Avaliação dos níveis de metilação do elemento repetitivo LINE-1	119
5.3	Perfil global de metilação do DNA no melanoma cutâneo.....	120
5.4	Análise da expressão de genes candidatos	130
5.5	Busca de assinaturas epigenéticas específicas	136
6	CONCLUSÃO	140
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	144

ANEXOS

Anexo 1 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

Anexo 2 Lista dos 516 genes diferencialmente metilados
independentemente do *background* mutacional de
melanomas cutâneos primários.

1 INTRODUÇÃO

1.1 MELANOMA CUTÂNEO – EPIDEMIOLOGIA E ASPECTOS CLÍNICOS

Tumores que se originam na pele são os mais frequentes no homem, sendo que os carcinomas de pele não-melanoma (carcinoma de células basais e carcinoma de células escamosas) constituem a maior porcentagem destes, e apresentam prognóstico favorável. Os melanomas cutâneos representam apenas 4% dos tumores de pele e, no entanto, são responsáveis por 75% de todas as mortes causadas por câncer de pele, evidenciando desta forma um comportamento agressivo (BEDDINGFIELD 2003).

O melanoma é um tumor maligno originário de melanócitos, células presentes principalmente na camada basal da epiderme e responsáveis pela produção do pigmento foto-protetor melanina. Estudos apontam que as células precursoras de melanócitos maduros, as células-tronco melanocíticas presentes na derme, também podem sofrer transformação maligna e originar melanomas (GRICHNIK et al. 2006; KYRGIDIS et al. 2010; HOERTER et al. 2012a e b). Durante a embriogênese, os precursores melanocíticos são formados na crista neural, e a partir desta região migram para diversos locais, como a pele, olhos, leptomeninges e membranas mucosas (vulva, ânus e porção superior do esôfago). Melanomas podem se

originar nos sítios anatômicos acima citados, mas o melanoma cutâneo é a forma mais frequentemente detectada (KAWAKAMI e FISHER 2011; Melanoma Molecular Map Project-MMMP 2013a).

1.1.1 Epidemiologia do melanoma cutâneo

Para o ano de 2014, são estimados 1.665.540 casos novos de câncer nos Estados Unidos, com 585.720 mortes. Deste total, aproximadamente 76.100 casos e 9.710 mortes serão decorrentes de melanoma cutâneo (SIEGEL et al. 2014). No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), no ano de 2014 serão diagnosticados 302.350 novos casos de câncer em homens, dos quais 2.960 serão melanomas; nas mulheres serão 274.320 novos casos, destes, 2.930 melanomas cutâneos (Ministério da Saúde 2014).

As taxas de incidência e mortalidade globais cresceram continuamente nas últimas décadas para o melanoma cutâneo, embora a taxa de mortalidade em um ritmo menor. Os fatores que podem contribuir para tal discrepância são diversos, como diagnósticos mais precoces, aumento de políticas preventivas, e alterações nos critérios de classificação dos tumores de pele (BEDDINGFIELD 2003).

O melanoma cutâneo apresenta uma distribuição diferenciada de acordo com algumas características biológicas dos indivíduos de uma mesma população. Indivíduos com mais de 55 anos são mais suscetíveis à doença, especialmente aos melanomas nodulares, enquanto que em indivíduos mais jovens este câncer é raro, e se apresenta em geral na forma

de melanomas extensivos superficiais (BATAILLE e VRIES 2008). De maneira geral, o melanoma cutâneo acomete ambos os sexos na mesma proporção, mas com distribuição heterogênea considerando os sítios anatômicos: enquanto em mulheres os membros (especialmente pernas) são o sítio principal de ocorrência, homens desenvolvem melanomas com mais frequência no tronco. Esta diferença entre os gêneros provavelmente reflete características genéticas, visto que nevos pigmentares, por exemplo, também são distribuídos diferencialmente entre meninos e meninas durante a infância (HARRISON et al. 2000; BATAILLE e VRIES 2008).

O melanoma cutâneo também apresenta incidência variável de acordo com a etnia: caucasianos têm de 10 a 20 vezes mais chances de desenvolver este câncer quando comparados com hispânicos e negros. Além disso, indivíduos não-brancos desenvolvem com maior frequência melanomas nas palmas das mãos e solas dos pés, principalmente os subtipos nodulares e lentiginosos, raramente apresentando melanomas em outras regiões do corpo (CRESS e HOLLY 1997; BATAILLE e VRIES 2008). Tais diferenças na incidência do melanoma e seus diferentes subtipos de acordo com a características étnicas também refletem componentes genéticos distintos, como por exemplo maior ou menor quantidade de melanina (conhecida proteína fotoprotetora) na pele.

1.1.2 Fatores de risco

Os fatores de risco para o desenvolvimento de melanomas cutâneos podem ser subdivididos de acordo com a etiologia genética ou ambiental,

mas atuam de maneira integrada em todas as circunstâncias. A exposição a raios solares é um dos fatores de risco mais relevantes, embora a compreensão de seus efeitos no organismo ainda seja alvo de pesquisa (BATAILLE e VRIES 2008). As radiações dos raios solares causam danos diretos ao DNA, com a formação de dímeros de pirimidina, em sua maioria corrigidos pelo sistema de reparo do DNA; e também danos indiretos, decorrentes de espécies reativas de oxigênio (DAVIES et al. 2002; VOLKOVOVA et al. 2012).

O padrão de exposição à luz solar exhibe relação com o surgimento do melanoma. Episódios de exposição intensa a raios solares, principalmente na infância, estão relacionados com o desenvolvimento posterior da doença, enquanto que a exposição ocupacional à luz UV está associada com um efeito protetor (GANDINI et al. 2005; BATAILLE e VRIES 2008).

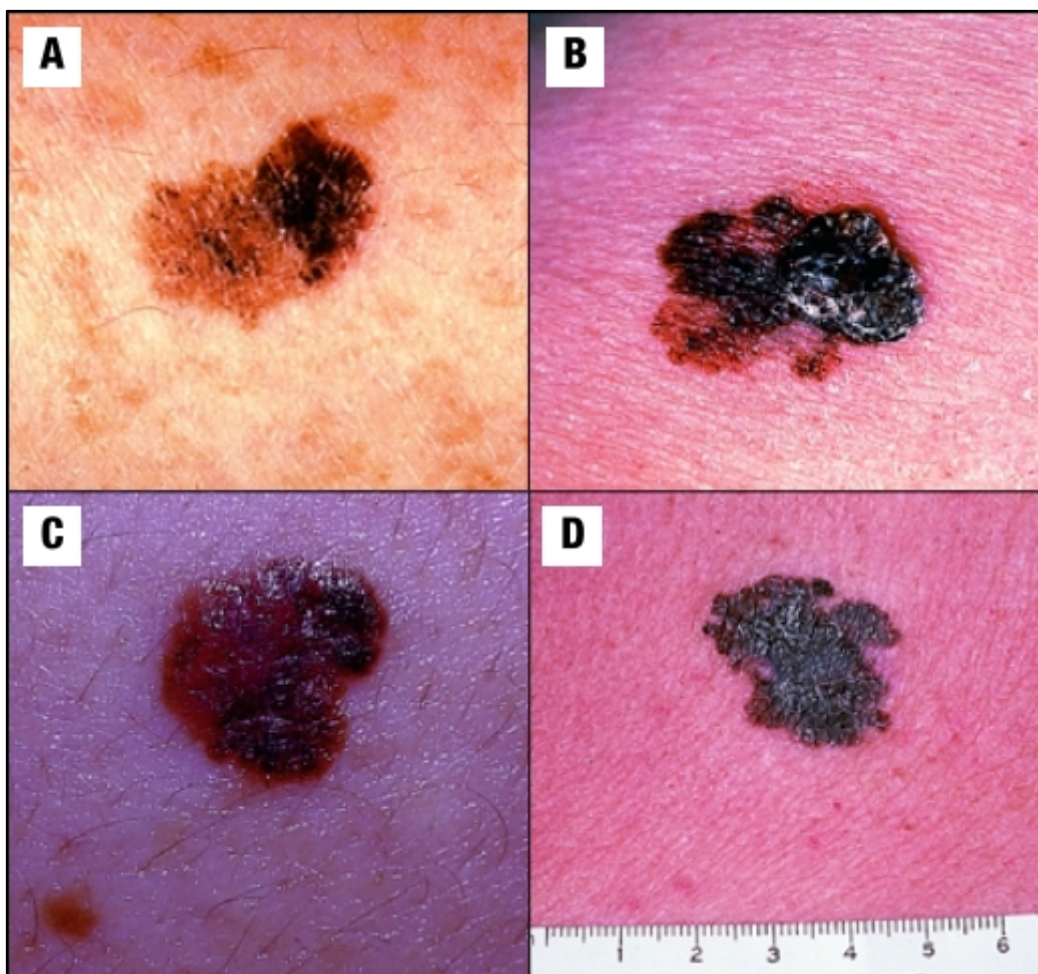
Assim como em todos os cânceres, a idade avançada é um fator de risco preponderante, com a idade média de diagnóstico de melanoma variando entre 45-55 anos. No entanto, indivíduos com menos de 40 anos também possuem risco de desenvolver este tipo de câncer (MMMP 2013b). A ocorrência de mais de um afetado na família também é um fator de risco relevante, visto que 5-10% de todos os melanomas diagnosticados estão em um contexto de histórico familiar da doença (VOLKOVOVA et al. 2012), indicando a existência de um componente genético de predisposição.

As características fenotípicas mais associadas com melanomas cutâneos são pele clara, cabelos ruivos ou loiros e presença de sardas e nevos displásicos (VOLKOVOVA et al. 2012). Os nevos displásicos

desenvolvem-se a partir de nevos típicos e apresentam algumas características semelhantes ao melanoma, como bordas e pigmentação irregulares. Indivíduos portadores destes nevos têm risco até 20 vezes maior de desenvolver melanoma (SILVA et al. 2011). A síndrome do nevo atípico, caracterizada pela presença >100 nevos regulares, em associação a um ou mais nevos atípicos, também está relacionada a um risco aumentado. No entanto, apesar da relevância como fator de risco, a maioria dos nevos displásicos não se desenvolve em melanoma, pois entram em senescência durante o desenvolvimento do indivíduo (RIKER et al. 2010).

1.1.3 Diagnóstico e subtipos de melanoma

A maneira mais eficiente de aumentar a sobrevida de pacientes com melanoma é por meio da detecção precoce da doença. O melanoma em seu estágio inicial é caracterizado por um conjunto de sinais conhecido como diretrizes ABCD: (A) assimetrias na lesão, visto que a taxa de desenvolvimento não é uniforme; (B) bordas irregulares, devido ao crescimento não uniforme; (C) variação na cor, pois o crescimento desordenado gera vários tons de marrom e manchas pretas; e (D) diâmetro da lesão maior que 6 mm (**Figura 1**). No entanto, o diagnóstico definitivo só pode ser realizado pela biópsia da lesão (RIGEL e CARUCCI 2000).



Fonte: Adaptada de (RIGEL e CARUCCI 2000).

Figura 1 - Ilustração das diretrizes ABCD para identificação de melanomas.

A: melanoma apresentando lesão assimétrica. B: melanoma com bordas irregulares. C: melanoma apresentando variação de cores. D: melanoma com diâmetro >6mm.

O trabalho publicado por CLARK et al. (1969) foi o primeiro a categorizar os melanomas de acordo com características histológicas e padrões macroscópicos, como descrição das áreas do corpo mais afetadas. O surgimento de variantes clínicas mais raras nos anos seguintes resultou em aumento da classificação, sendo os subtipos mais frequentes os seguintes: melanoma extensivo superficial, melanoma nodular, melanoma lentigo maligno, e melanoma acral lentiginoso.

O melanoma extensivo superficial está associado com o desenvolvimento de nevos displásicos e acomete comumente o tronco em homens e membros inferiores em mulheres, em todas as faixas etárias. Este subtipo de melanoma é o mais frequente, sendo caracterizado por uma fase de crescimento radial (padrão de proliferação celular horizontal), na qual os melanócitos epitelióides se distribuem aleatoriamente em todos os níveis da epiderme (CLARK et al. 1969).

O melanoma nodular não possui local preferencial para desenvolvimento, apresenta aspecto polipóide, com o surgimento ocasional de ulcerações. É o segundo subtipo mais frequente, e diferentemente dos demais, apresenta apenas a fase de crescimento vertical (proliferação celular verticalizada, em direção às camadas inferiores da pele) (CLARK et al. 1969).

O melanoma lentigo maligno ocorre preferencialmente em idosos, em áreas sujeitas à exposição solar contínua, como a face e pescoço. Neste subtipo, ocorre uma proliferação de melanócitos atípicos em direção à interface derme-epiderme, de maneira confluenta. A massa invasiva é composta por células fusiformes, além da produção de tecido fibroso pelas células neoplásicas (reação desmoplásica) (CLARK et al. 1969).

O melanoma acral lentiginoso é menos freqüente, desenvolvendo-se na palma das mãos e na sola dos pés, com a fase de expansão radial caracterizada pela proliferação aleatória de melanócitos atípicos, e a fase de crescimento vertical caracterizada pela presença de células fusiformes (CLARK et al. 1969).

1.1.4 Fatores prognósticos e estadiamento do melanoma cutâneo

Os sistemas de classificação são clinicamente importantes, pois permitem estratificar e agrupar pacientes de acordo com suas características clínicas e patológicas, as quais refletem os riscos aos quais cada paciente está submetido, facilitando desta forma o manejo clínico (BALCH et al. 2004).

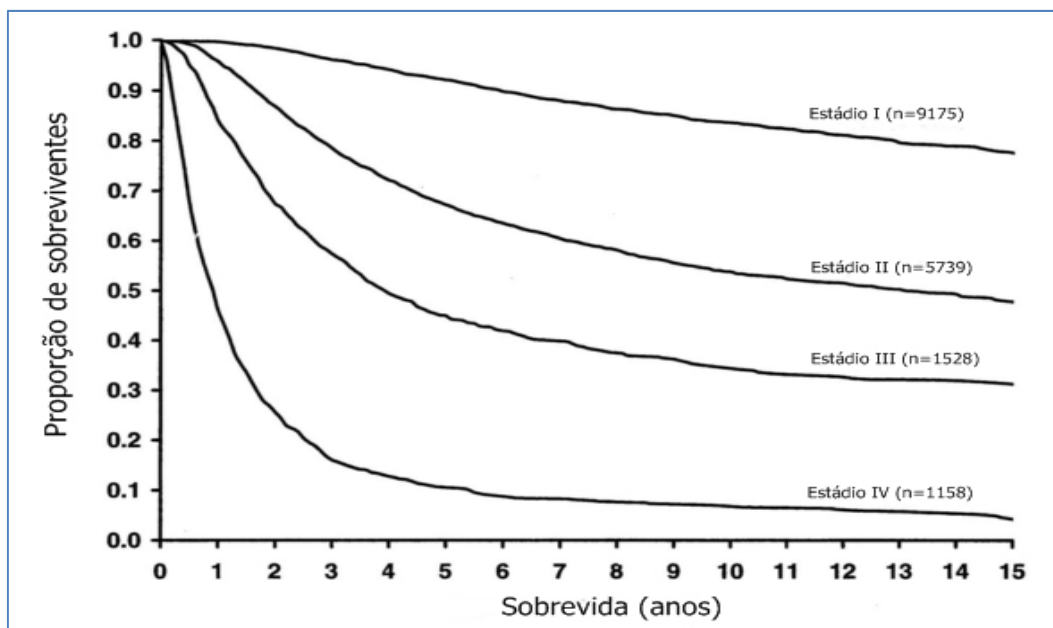
O sistema de estadiamento patológico TNM proposto pela American Joint Committee on Cancer (AJCC) é amplamente difundido e possui grande acurácia, sendo baseado na combinação de três fatores: (T) profundidade do tumor, medida no melanoma pela escala de Breslow (em mm), em associação ou não à presença de ulceração; (N) avaliação de linfonodos regionais, verificando a presença e quantidade de nódulos metastáticos (macrometástases e micrometástases) e metástases intra-linfáticas; (M) presença de metástases à distância, em combinação com a concentração sérica da enzima lactato desidrogenase. A combinação destes fatores resulta em 4 estádios patológicos principais da doença (subdivididos em 10 grupos) (**Quadro 1**), os quais diferem significativamente nas taxas de sobrevida. Pacientes com melanomas classificados como estágio I apresentam altas taxas de sobrevida, enquanto tumores no estágio IV estão relacionados com prognóstico desfavorável (**Figura 2**) (BALCH et al. 2004, 2001).

Quadro 1 – Estadiamento patológico para pacientes com melanoma cutâneo, de acordo com o sistema TNM.

Estadiamento patológico			
O	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0
IB	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0
IIB	T3a	N0	M0
	T3b	N0	M0
IIC	T4a	N0	M0
	T4b	N0	M0
IIIA	T1-4a	N1a	M0
IIIB	T1-4a	N2a	M0
	T1-4b	N1a	M0
	T1-4b	N2a	M0
	T1-4a	N1b	M0
IIIC	T1-4a	N2b	M0
	T1-4a	N2c	M0
	T1-4b	N1b	M0
	T1-4b	N2b	M0
	T1-4b	N2c	M0
	Tx	N3	M0
IV	Tx	Nx	M1

Legenda: T1-4 (1mm; 1-2mm; 2-4mm; >4mm) a-b(sem ulceração; com ulceração); N1-3(1 nódulo em linfonodos regionais; 2-3 nódulos em linfonodos regionais; mais que 4 nódulos em linfonodos regionais) a-b-c (micrometástase; macrometástase; metástase satélite em trânsito); M0-M1 (sem metástase à distância; com metástase à distância) Tx: qualquer T; Nx: qualquer N.

Fonte: Adaptado de EDGE et al. (2010)



Fonte: Adaptado de BALCH et al. (2004).

Figura 2 - Curva de sobrevida de grupo de pacientes afetados por melanoma cutâneo estratificados de acordo com o estadiamento patológico. Para esta análise, $p < 0,0001$, n= número de pacientes.

A espessura do tumor é um dos fatores prognósticos mais relevantes no melanoma cutâneo. Dois sistemas de mensuração são utilizados: a escala de Breslow e os níveis de Clark. A escala de Breslow foi desenvolvida na década de 1970 e é baseada na maior distância entre o ápice da camada granular epidermal e o ponto mais profundo de invasão de células cancerosas; quanto maior a distância, maior a capacidade de metastatização e, conseqüentemente, pior o prognóstico. Os níveis de Clark descrevem a invasão do melanoma de acordo com as quatro camadas da pele (BALCH et al. 2001, 2004).

O comprometimento de linfonodos locais também é importante marcador prognóstico, com avaliação da quantidade de nódulos metastáticos nos linfonodos, de micrometástases ou macrometástases, e de

metástases entre o melanoma primário e o linfonodo sentinela. Observa-se que um número maior de nódulos metastáticos e a presença de metástases intra-linfáticas estão relacionados com pior prognóstico (BALCH et al. 2001, 2004).

A presença de metástases, a quantidade de focos, e a distância destes em relação à lesão primária, também são fatores prognósticos importantes, sendo que quanto maior o número e maior a distância do foco primário, mais desfavorável o prognóstico. Os principais sítios de metástase à distância do melanoma são os pulmões, o sistema nervoso central, ossos, fígado e intestino. Metástases para os pulmões são comuns, sendo em geral o primeiro sinal de metástase visceral. Já metástases para ossos e intestinos normalmente ocorrem quando o câncer já está em estado avançado (BALCH et al. 2001, 2004; DAMSKY et al. 2010).

A ulceração em melanomas é definida como a ausência de uma camada intacta de epiderme em qualquer local do melanoma, com a presença de uma camada fina de epiderme circundando esta lesão. A presença de ulceração está relacionada com a espessura do tumor, e quando analisada independentemente, está também associada a pior prognóstico (BALCH et al. 2004).

O melanoma cutâneo apresenta com frequência células do sistema imune em sua composição (infiltrado inflamatório). No entanto, a população de linfócitos predominante e o tipo de resposta imune subsequente podem variar de maneira considerável entre os tumores, de forma que o papel

prognóstico da presença de infiltrado inflamatório na lesão ainda é discutível (OBLE et al. 2009).

1.2 GENÉTICA DO MELANOMA CUTÂNEO

Para compreender a etiologia genética do melanoma cutâneo, como de qualquer outro tipo de câncer, é necessário discernir mutações causais (*driver mutations*), que são aquelas raras mutações em um tumor que conferem vantagem proliferativa, de eventos mutacionais sem grande impacto funcional (*passenger mutations*), que compõem a maioria das alterações genéticas (VOGELSTEIN et al. 2013). Essa distinção é complexa em geral, e ainda mais desafiadora no genoma de melanomas: devido à exposição da pele à radiação UV, o melanoma cutâneo exibe uma taxa muito maior de mutações somáticas do que outros tipos de câncer (DUTTON-REGEISTER e HAYWARD 2012; HODIS et al. 2012).

Algumas das principais mutações no melanoma ocorrem em genes na cascata de sinalizaçãoda proteína do retinoblastoma RB1, que está relacionada com o controle do ciclo celular, especificamente com o ponto de checagem entre as fases G1 e S: dentre os genes reportados com alterações nesta via estão *CDKN2A* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A), *CDK4* (cyclin-dependent kinase 4), e *RB1* (retinoblastoma 1), entre outros (TSAO et al. 2012). Um dos genes dessa via de sinalização, *CDKN2A*, é de extrema relevância em melanomas. Localizado no braço curto do cromossomo 9 (9p21), este gene composto por quatro éxons codifica duas

proteínas distintas: p16^{INK4a} e p14^{ARF}. A p16^{INK4a} inibe a atividade da proteína CDK4, que por sua vez é capaz de fosforilar a proteína RB. A proteína RB fosforilada induz a atividade do fator de transcrição E2F, responsável por transcrever genes da maquinaria de divisão celular. Desta forma, a perda de atividade de p16^{INK4a} induz à progressão do ciclo celular (KOH et al. 1995). A p14^{ARF}, por sua vez, promove a degradação da proteína HDM2, a qual é responsável por sinalizar a degradação de p53 por ubiquitinação. Assim, a perda da atividade de p14^{ARF} resulta em diminuição dos níveis de p53, responsável pela parada do ciclo celular em resposta a eventos de quebra de DNA de fita dupla (ZHANG et al. 1998).

Mutações germinativas no gene *CDKN2A*, assim como deleções e inserções, são causa de grande parte dos casos de melanoma familiar (TSAO et al. 2012). Mutações e principalmente deleções deste gene também são muito prevalentes (~40%) em melanomas esporádicos (CESINARO et al. 2010; HODIS et al. 2012). Estudos funcionais em murinos demonstraram que a ausência do gene *CDKN2A*, juntamente com mutações ativadoras do gene *NRAS* (neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog), resultam no surgimento de tumores que mimetizam melanomas (VANBROCKLIN et al. 2010).

Outra via biológica que acumula um grande número de componentes alterados no melanoma cutâneo é a cascata de sinalização de proteína quinases ativadas por mitógenos (MAPK), responsável pela regulação do crescimento celular e sinais de sobrevivência (DUTTON-REGESTER e HAYWARD 2012). Nesta via encontra-se o gene *KIT* (v-kit Hardy-Zuckerman

4 feline sarcoma viral oncogene homolog), que codifica um receptor de membrana com atividade tirosina-quinase e apresenta a citocina denominada fator de célula-tronco como ligante (gene *KITLG*). O gene *KIT* exibe amplificação ou mutação em melanoma de mucosa (39%), melanoma acral (36%) e em melanomas de áreas expostas cronicamente ao sol (28%) (CURTIN et al. 2006). Trabalho recente de sequenciamento de exoma confirmou que mutações e amplificações de *KIT* são eventos *drivers* no melanoma cutâneo, mas revelou uma frequência bem menor de alterações (6%), não restrita aos subtipos acral e de mucosa (HODIS et al. 2012). Tumores estromais gastrointestinais também apresentam mutações em *KIT* e são tratados com o medicamento imatinib, que provoca boa resposta terapêutica nestes tumores. Em decorrência disso, o medicamento imatinib foi testado em pacientes com melanoma portadores de mutação em *KIT* TSAO et al. (2012); pacientes com amplificações de *KIT* apresentaram 23,3% de resposta parcial, com estabilização da doença em 30,2% dos pacientes, demonstrando assim um efeito moderado desta terapia no melanoma cutâneo (GUO et al. 2011).

O gene *BRAF* (B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase) codifica a proteína com atividade de quinase B-Raf, a qual está relacionada com a transdução de sinais extracelulares, resultando na ativação da via MAPK (DUTTON-REGESTER e HAYWARD 2012). Em aproximadamente 60% dos melanomas TSAO et al. (2012), o gene *BRAF* sofre substituição de uma valina por um ácido glutâmico no códon 600 (BRAFV600E). A mutação BRAFV600E (*hot spot* no gene *BRAF*) ocorre preferencialmente em lesões

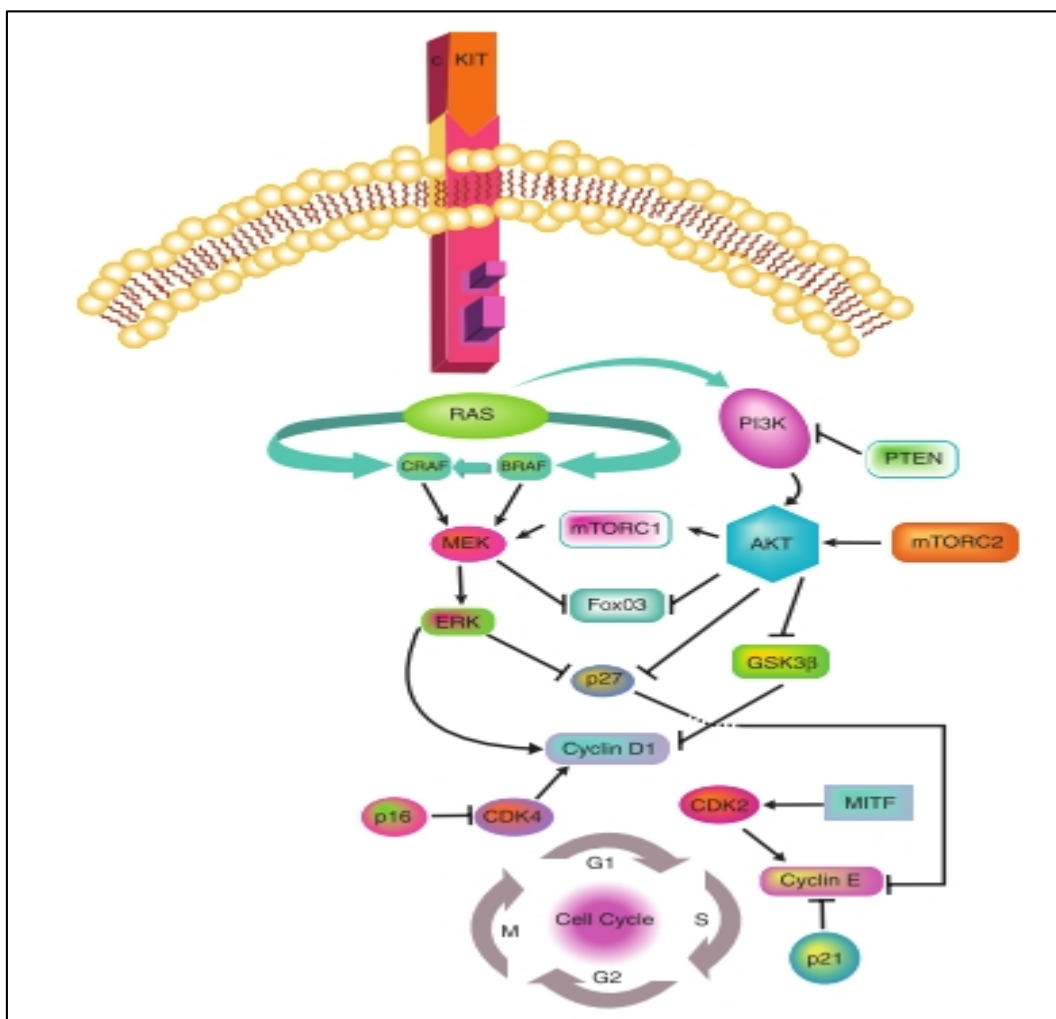
originadas por exposição intermitente ao sol, visto que melanomas de exposição crônica e áreas sem exposição solar raramente apresentam a mesma (BAUER et al. 2011). No entanto, a transição de timina para adenina (na posição 1799 da região codificadora) que resulta na mudança de códon para ácido glutâmico não é característica de uma assinatura mutacional provocada pelo dano da radiação UVB. Provavelmente, esta mutação no gene *BRAF* é decorrente de dano causado pelas espécies reativas de oxigênio, as quais são originadas a partir da incidência de raios UVA, uma vez que os melanócitos são ineficientes no reparo ao DNA oxidado. (WANG et al. 2010). Esta mutação também é encontrada em 80% dos nevos displásicos, sugerindo que embora importante para a melanomagenese, não é suficiente para a transformação maligna (SALDANHA et al. 2004), havendo necessidade de mutações concomitantes em outros genes.

Alterações simultâneas nos genes *BRAF* e *MITF* (microphthalmia-associated transcription factor) parecem induzir a formação de melanomas *in vitro* e *in vivo* (GARRAWAY et al. 2005). Outros modelos em murinos confirmaram o potencial tumorigênico da mutação BRAFV600E, onde a presença desta mutação associada à perda de função de *PTEN* (phosphatase and tensin homolog) resultou no surgimento de melanoma (DANKORT et al. 2009). Já outro modelo detectou a formação de melanoma em 60-70% de camundongos que super-expressavam apenas o mutante BRAFV600E; a presença concomitante de uma mutação em *CDKN2A* resultou no aparecimento de melanomas múltiplos, com diminuição do tempo de latência para a formação do tumor (DHOMEN et al. 2009).

A descoberta desse *hot spot* na região codificadora de *BRAF* foi um grande marco no tratamento do melanoma, devido ao seu potencial terapêutico com a utilização de inibidores de proteína quinases. Dentre tais inibidores, o medicamento Vemurafenib demonstrou resposta em mais de 50% dos pacientes em ensaios clínicos (CHAPMAN et al. 2011) e atualmente é indicada para casos de melanoma com mutação em *BRAF*.

A família de proteínas com atividade GTPase intrínseca RAS contém três genes e está associada com a transdução de sinal de fatores de crescimento (MALUMBRES e BARBACID 2003). Estas proteínas manifestam atividade alterada nos tumores em geral devido a mutações que alteram sua atividade de GTPase, levando a uma ativação constitutiva das vias MAPK, PI3K/AKT e Ral-GDS (MALUMBRES e BARBACID 2003). Estima-se que mutações nos genes *NRAS*, *KRAS* (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) e *HRAS* (Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog) estão presentes em 20%, 2% e 1% de todos os melanomas, respectivamente (MILAGRE et al. 2010). De todo o espectro de mutações relatado no gene mais frequentemente mutado da família, *NRAS*, a alteração mais comum é a substituição de uma leucina por uma glutamina na posição 61 (SMALLEY 2010). Mutações nos diferentes membros desta família estão presentes em melanomas com características clinico-patológicas distintas: enquanto ativações no gene *HRAS*, juntamente com mutações nos genes *CDKN2A* ou *TP53* (tumor protein p53), estão associadas a melanoma não-metastático, ativações no gene *NRAS*, na presença de mutação em *CDKN2A*, estão relacionadas a metástases em linfonodos e à distância

(ACKERMANN et al. 2005). A **Figura 3** ilustra a intersecção entre as vias MAPK e PI3K, nas quais as proteínas c-KIT, RAS e BRAF estão frequentemente alteradas no melanoma cutâneo.



Fonte: Adaptado de SMALLEY (2010).

Figura 3 - Ilustração esquemática mostrando as proteínas c-KIT, RAS e BRAF constituindo as vias BRAF/MEK/ERK e PI3K/AKT, relacionadas com o controle do ciclo celular. Esta ilustração esquematiza as interações proteicas entre os componentes da via MAPK e PI3K. Os pirulitos amarelos representam a membrana plasmática. Setas com cabeça representam a ativação de uma proteína específica. Setas com um traço perpendicular na ponta representam a inibição da atividade protéica que um componente causa no outro.

O gene *TERT* (telomerase reverse transcriptase) codifica a subunidade catalítica da enzima *transcriptase reversa*, responsável pela manutenção do tamanho dos telômeros. Estudos recentes (HORN et al. 2013; HUANG et al. 2013) identificaram mutações germinativas na região promotora deste gene em uma família de melanoma hereditário, além da presença de mutações somáticas nos genomas de melanomas familiares e esporádicos, as quais criam um novo sítio de ligação para a família de fatores de transcrição Ets (E26 transformation-specific). Ensaio de atividade de promotor com a presença da mutação germinativa detectada nos casos de melanoma hereditário (uma transversão T>G a 57 pares de base do início do sítio de transcrição) detectaram um aumento dos níveis de expressão do gene *TERT*. Mutações no gene *TERT* foram detectadas em alta frequência no genoma de melanomas esporádicos (85% de tecidos metastáticos e 33% de amostras de melanomas primários), localizadas a 124, 125, 138, 139 e 146 pares de base do sítio de início de transcrição (HORN et al. 2013). Por outro lado, mutações germinativas afetando o promotor de *TERT* são causa rara de predisposição a melanoma, visto que o grupo de pacientes brasileiros de melanoma familiar investigado em estudo de nosso grupo foi negativo quanto a este tipo de alteração (AGUIAR 2014).

TSAO et al. (2012) classificaram os genes responsáveis por fatores de suscetibilidade ao desenvolvimento do melanoma, como cor da pele, em *loci* de risco moderado, em contrapartida aos *loci* de alto risco, cujas mutações estão relacionadas a características de células neoplásicas, como *CDKN2A*. Neste contexto de risco moderado, algumas variantes nos genes

MC1R (melanocortin 1 receptor) e *MITF* (microphthalmia-associated transcription factor) estão relacionadas com uma maior probabilidade de desenvolvimento do melanoma (RAIMONDI et al. 2008; YOKOYAMA et al. 2011). Em estudo de nosso grupo, conduzido em um grupo brasileiro de 48 pacientes exibindo predisposição a melanomas, identificamos em um indivíduo que desenvolveu melanomas múltiplos (sem histórico familiar) a variante c.G1075A (E318K) do gene *MITF*, que aumenta a atividade deste fator de transcrição (AGUIAR 2014).

Recentemente, MACGREGOR et al. (2011) realizaram um estudo de associação genômica (*genome wide association study* - GWAS) em uma coorte de pacientes portadores de melanoma e indivíduos saudáveis, identificando o *locus* 1q21.3 como uma região de suscetibilidade genética. Na região delimitada pelo estudo, o melhor gene candidato é *SETDB1* (SET domain, bifurcated 1), que possui atividade de metiltransferase de histona. Estudo prévio em modelo de *zebrafish* com a mutação BRAFV600E observou diminuição de sobrevivência de animais que apresentavam ganho de cópias do oncogene *SETDB1* em adição à mutação em *BRAF*, além de manifestação precoce da doença, quando comparados com o grupo portador apenas da mutação *BRAF* (CEOL et al. 2011).

1.3 MECANISMOS EPIGENÉTICOS NO MELANOMA CUTÂNEO

O termo epigenética é utilizado para designar mecanismos moleculares responsáveis por controlar a expressão de um gene, sem que a sequência nucleotídica seja modificada. Como característica primordial, a modificação epigenética pode ser transmitida para gerações celulares subsequentes, sendo nesse sentido passível de ser herdada, mas é um evento reversível (TABY e ISSA 2010; JONES 2012).

Inúmeros processos biológicos são controlados por tais mecanismos epigenéticos, como embriogênese, diferenciação celular, senescência, *imprinting* genômico, entre outros. Dentre os vários mecanismos epigenéticos, os mais estudados são a metilação de DNA, as modificações covalentes em histonas, e a regulação da expressão gênica por RNAs não-codificadores de proteína. Nas últimas décadas, a comunidade científica tem identificado falhas de tais mecanismos em muitas doenças, como distúrbios neurológicos, complicações cardíacas, patologias congênitas, doenças crônicas como diabetes e, principalmente, na origem e progressão de diversos tipos de câncer (TABY e ISSA 2010).

O grau de compactação da cromatina e sua estrutura espacial são cruciais na determinação do nível de expressão genômica de determinado segmento. O acesso dos diversos fatores de transcrição às suas regiões-alvo é limitado pelo nível de condensação da cromatina e, neste cenário, as modificações covalentes nas caudas de histonas contribuem fundamentalmente para definir esta acessibilidade. Diversas enzimas são

responsáveis por catalisar modificações covalentes nas caudas de histonas, como as metilases e desmetilases de histonas, as acetilases e desacetilases de histonas, entre outras. Padrões específicos de modificações em histonas são reconhecidos por proteínas reguladoras de cromatina, que a tornam mais ou menos acessível aos fatores de transcrição, dependendo da combinação resultante (YOO e JONES 2006; TABY e ISSA 2010). Em células cancerosas, inúmeras modificações covalentes específicas já foram detectadas, como por exemplo, a perda da acetilação na lisina 9 da cauda da histona H3, resultando no silenciamento gênico de supressores tumorais em próstata e ovário (FÜLLGRABE et al. 2011), por exemplo. A atividade alterada de enzimas da maquinaria epigenética que catalisam modificações de histonas também está relacionada com o desenvolvimento de neoplasias, como alterações na atividade da metil-transferase de histona EZH2, que catalisa a tri-metilação na lisina 27 da histona H3, modificação detectada em diversos tipos de câncer, entre eles o melanoma cutâneo (MARTINEZ-GARCIA e LICHT 2010). O aumento da expressão de *EZH2* já foi associado a melanomas mais espessos e com pior sobrevida: a sobrevida de 5 anos em pacientes com altos níveis de expressão da EZH2 foi de 48%, em comparação a 71% naqueles com baixos níveis, demonstrando ser um potencial biomarcador de prognóstico (BACHMANN et al. 2006).

Pequenos RNAs não-codificadores (microRNAs ou miRNAs) são genes responsáveis por regular negativamente a transcrição gênica de seus alvos, com os quais possuem complementaridade com a extremidade 3' não-traduzidas do RNA mensageiro (mRNA) (GHILDIYAL e ZAMORE 2009).

Em células neoplásicas, observa-se de maneira geral que os níveis de expressão de miRNAs são diminuídos, apesar de alguns miRNA específicos estarem regulados positivamente. Esta alteração nos níveis de expressão de alguns miRNAs pode estar relacionada a defeitos em sua biogênese, seja através da menor expressão das enzimas de processamento DROSHA e DICER (MERRITT et al. 2008), ou devido a mutações nestas enzimas, como reportado por TORREZAN et al. (2014) para tumores de Wilms. Em melanoma, o *miR-221/222* foi relacionado com uma alteração nos níveis de expressão dos genes *KIT* e *CDKN1B* (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B), alterando a regulação do ciclo celular (FELICETTI et al. 2008). Também o aumento da expressão do *miR-30b/30d* foi identificado como marcador de progressão tumoral em melanomas, provocando o silenciamento do gene *GALNT7* (polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 7), aumentando a capacidade migratória das células tumorais e diminuindo a resposta imune (GAZIEL-SOVRAN et al. 2011).

Apesar das modificações em histonas e do silenciamento gênico pelos miRNAs desempenharem papéis extremamente importantes na carcinogênese, o mecanismo epigenético mais estudado ainda é a metilação do DNA, que consiste na ligação covalente do radical metil à posição 5' do anel da base nitrogenada citosina, quando esta se encontra seguida de guanina na mesma fita de DNA - estrutura denominada dinucleotídeo 5'CpG3'. Esta reação é catalisada por enzimas da família DNA metiltransferase (DNMT), presentes na forquilha de replicação durante a fase S do ciclo celular e que utilizam o substrato S-adenosilmetionina como

doador de radicais metil (BIRD 2002; YOO e JONES 2006). Em mamíferos, três enzimas principais são responsáveis por realizar a metilação do DNA durante o ciclo celular: DNMT1, que possui uma afinidade maior por fitas de DNA hemi-metiladas, responsável por estabelecer a metilação na fita nova, e assim propagar o padrão de metilação durante a replicação semi-conservativa do DNA; DNMT3a e DNMT3b, responsáveis principalmente pela metilação *de novo*, adicionando radicais metil em regiões previamente não metiladas (BIRD 2002).

Os dinucleotídeos CpG apresentam uma frequência abaixo da esperada no genoma, em decorrência da desaminação espontânea que ocorre em 5-metilcitosinas, dando origem a timinas ao longo do processo evolutivo (BIRD 2002; TABY e ISSA 2010). Adicionalmente, os CpGs exibem uma distribuição assimétrica pelo genoma, com agrupamento em regiões especiais denominadas ilhas CpG, tradicionalmente definidas como um segmento de >200 pares de base no qual o conteúdo de citosinas e guaninas é superior a 50% e a razão entre CpGs observados e esperados é $\geq 0,6$ (TAKAI e JONES 2002). Parte das ilhas CpG localizam-se à 5' de parte dos genes de mamíferos (presentes em até 70% dos genes), possuem tamanho médio de 1.000 pares de bases, sendo em grande parte elemento constituinte dos promotores destes genes (BIRD 2002; TAKAI e JONES 2002). Os promotores regulam a transcrição gênica, e as ilhas CpG mapeadas nestas regiões são consideradas um fator adicional neste controle. A metilação em ilhas CpGs de promotores em geral se correlaciona com inibição da transcrição gênica, por meio de dois mecanismos: (i)

inibição direta do reconhecimento e ligação à sequência-alvo pelos fatores de transcrição; (ii) reconhecimento da ilha CpG metilada por proteínas específicas, que recrutam um complexo de remodelamento de cromatina, como enzimas relacionadas às modificações covalentes de histonas, de forma a compactar a cromatina, tornando-a inacessível aos fatores de transcrição (BIRD 2002; BLOMEN e BOONSTRA 2011).

De maneira geral, dinucleotídeos CpG dispersos pelo genoma encontram-se extensivamente metilados, com exceção de ilhas CpG em regiões promotoras de genes que estão sendo expressos. O padrão de metilação é relativamente estável após ser estabelecido e está implicado em processos como inativação do cromossomo X, repressão de sequências de DNA repetitivas, *imprinting* genômico, assim como ativação/repressão de conjuntos específicos de genes durante a embriogênese e diferentes etapas de diferenciação celular e tecidual.

O panorama epigenético de um organismo é dinâmico, modificando-se ao longo do desenvolvimento, em diferentes estados fisiológicos, e também com o envelhecimento (BIRD 2002; BLOMEN e BOONSTRA 2011). Além disso, em diversos processos patológicos o padrão de metilação do DNA se apresenta alterado. No câncer, isso é detectado principalmente por dois eventos principais: diminuição na metilação global do genoma (hipometilação) e ganho de metilação em dinucleotídeos de ilhas CpG presentes em regiões promotoras (hipermetilação) de alguns genes. Grande acúmulo de evidências indica que estes distúrbios no padrão genômico de

metilação estão relacionados com o surgimento, desenvolvimento e malignização de tumores (TABY e ISSA 2010).

De maneira geral, dois padrões distintos principais são observados no genoma do câncer: i) o DNA sofre uma perda dos níveis globais de metilação, de modo que regiões constitutivamente silenciadas por metilação tornam-se ativas, como por exemplo, retrotransposons e outras sequências repetitivas, gerando instabilidade genômica. Além disso, a perda da metilação pode promover a ativação de proto-oncogenes previamente silenciados, potencialmente estimulando a proliferação celular; ii) as ilhas CpGs presentes em alguns promotores gênicos podem ser extensivamente metiladas e esse evento está relacionado com a repressão transcricional de supressores tumorais. Os genes supressores tumorais são responsáveis pelo controle de ciclo celular e outras vias relacionadas com proliferação, além de atuarem em mecanismos de reparo a danos de DNA. Com o silenciamento epigenético desses elementos regulatórios, a célula adquire então capacidade de divisão sem controle, não acatando a homeostase tecidual (YOO e JONES 2006; TABY e ISSA 2010).

1.3.1 Metilação do DNA no melanoma cutâneo

No melanoma cutâneo, genes relacionados com câncer que apresentam metilação aberrante do DNA podem ser marcadores de diagnóstico precoce, assim como podem estar relacionados com evolução e prognóstico da doença. O gene supressor tumoral *RASSF1A* (Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1) é um importante

regulador de processos como apoptose, migração e controle do ciclo celular. O aumento dos níveis de metilação na sua região promotora está relacionado com estágios tumorais mais avançados no melanoma cutâneo (GREENBERG et al. 2014). HOON et al. (2004) constataram que *RASSF1A* encontrava-se metilado em 57% de amostras de tumores metastáticos e, além deste gene, a análise de *RARβ2* (*retinoic acid receptor, beta 2*), *MGMT* (*O-6-methylguanine-DNA methyltransferase*) e *DAPK* (*death-associated protein kinase 1*) na mesma coorte revelou frequências de metilação de 70%, 34% e 19%, respectivamente.

TANEMURA et al. (2009) analisaram o perfil de metilação de 6 genes previamente relacionados com câncer (*WIF1-WNT inhibitory factor 1*, *TFPI2-tissue factor pathway inhibitor 2*, *RASSF1A*, *RARβ2*, *SOCS - suppressor of cytokine signaling 1* e *GATA4-GATA binding protein 4*), além de 6 sequências repetitivas não-codificantes (*MINT1*, *MINT2*, *MINT3*, *MINT12*, *MINT17*, *MINT25*, e *MINT31*), para investigar a ocorrência de um fenótipo metilador de ilhas CpG (*CpG island methylator phenotype*) em melanomas primários e metastáticos. Os genes *WIF1*, *TFPI2*, *RASSF1A* e *SOCS* e as sequências *MINT17* e *MINT31* apresentaram hipermetilação em melanomas metastáticos em comparação a tumores primários, correlacionando este perfil de hipermetilação com pior prognóstico.

A hipometilação também parece ser fundamental para o desenvolvimento do melanoma: HOU et al. (2012) realizaram análise em larga escala do perfil de metilação de linhagens celulares de melanoma cutâneo. Estes autores compararam o perfil de metilação de linhagens

portadoras da mutação BRAFV600E com linhagens com a mutação silenciada por RNA de interferência, verificando a existência de grande número de genes hipometilados, além de hipermetilados, nas células de melanoma portadoras de BRAFV600E ativa.

A hipometilação global do DNA, característica de diversos tipos de cânceres, pode ser estimada através da verificação do *status* de metilação de elementos de transposição, que constituem grande parte da sequência do genoma de eucariotos. O elemento de transposição *Long interspersed element-1 (LINE-1)* faz parte da superfamília de elementos autônomos de retrotransposição que não possuem as grandes sequências repetitivas terminais – *Long Terminal Repeats (LTRs)*, constituindo >20% do genoma de mamíferos. Devido a sua grande representatividade nos genomas em que se encontra inserido, acredita-se que a interação entre o elemento *LINE-1* e o genoma seja de grande importância evolutiva e funcional (FURANO 2000). Uma meta-análise avaliou o nível de metilação em *LINE-1* em 2554 pacientes com câncer e 3553 controles, revelando que pacientes com câncer apresentaram hipometilação em *LINE-1* (BARCHITTA et al. 2014). O trabalho de Hyland e colaboradores (HYLAND et al. 2013) avaliou os níveis de metilação de *LINE-1* no sangue de pacientes com melanoma familiar, não encontrando associação entre metilação em *LINE-1* e risco de desenvolvimento de câncer. Até o momento, não há trabalhos na literatura investigando os níveis de metilação de *LINE-1* em melanomas esporádicos.

Estudos analisando o padrão global de metilação do DNA simultaneamente em inúmeros *loci* só foram publicados recentemente em

amostras de melanoma cutâneo. Um destes trabalhos de epigenômica de melanomas (THOMAS et al. 2014) foi publicado utilizando um painel de sítios CpG em 793 genes, sendo capaz de estratificar as 47 amostras estudadas em três subgrupos, de acordo com o perfil de metilação; um destes subgrupos apresentou hipermetilação na maioria dos genes, corroborando a hipótese de fenótipo metilador de ilhas CpG (*CIMP*) no melanoma cutâneo. Outro estudo (ECSEDI et al. 2014) observou o padrão de metilação de 1505 sítios CpG em regiões promotoras de 42 amostras de melanoma cutâneo; os autores reportaram associação entre um conjunto de 24 genes com diferença de metilação e a presença da mutação BRAFV600E em melanomas em estágios iniciais; no entanto, a mesma associação não foi encontrada em melanomas mais avançados. Neste mesmo trabalho recente, foi observado que tumores mais espessos apresentaram hipometilação em um conjunto de 45 genes, os quais se tornavam gradativamente mais metilados quando comparados com tumores mais finos.

Atualmente, o status de metilação de DNA de centenas de milhares de sítios CpG distribuídos pelo genoma (metiloma) pode ser investigado de maneira abrangente, a custo reduzido, utilizando tecnologias baseadas em microarranjos. A plataforma Illumina Infinium HD 450K Methylation Assay (HM450K) possibilita a análise simultânea >450.000 dinucleotídeos CpGs, representando 99% dos RefSeq genes, com média de 17 sítios CpG por gene, distribuídos em promotor, 5'UTR (5' *untranslated region*), primeiro exon, demais regiões gênicas (*gene body*), e 3'UTR (3' *untranslated region*)

(SANDOVAL et al. 2011). Aproximadamente 96% das ilhas CpG descritas no banco de dados UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>) são interrogadas na HM450K, com cobertura adicional em *island shores* (sequências de até 2kb que flanqueiam as ilhas), e em sequências que flanqueiam as *island shores* (até 4kb das ilhas), denominadas de *island shelves*. Outras categorias de sondas incluem sítios CpG localizados fora de ilhas CpG, sítios não-CpG identificados como metilados em *stem cells* humanas, sítios conhecidos como diferencialmente metilados entre tecido normal e tumor e entre diferentes tipos de tecidos, e ilhas CpG fora de regiões codificadoras (SANDOVAL et al. 2011).

A plataforma HM450K já é amplamente utilizada em estudos para determinação de perfis epigenômicos, inclusive na área da oncologia. Um estudo recente (LINDQVIST et al. 2014) comparou tumores de mama positivos para o marcador *HER2* com tecido mamário normal, e identificou 69 genes diferencialmente metilados como potenciais biomarcadores. Outro estudo (SHEN et al. 2013) com amostras de carcinoma hepatocelular e tecido não tumoral adjacente detectou um grande número de regiões intergênicas hipometiladas no tecido tumoral; a maior parte dos eventos de hipermetilação encontrava-se em promotores gênicos. Adicionalmente, este estudo mostrou dados da análise do tecido adjacente não tumoral, que revelou sondas capazes de diferenciar tecido cirrótico de não cirrótico, e tecido com vírus da hepatite C de tecidos sem infecção.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudo do padrão global de metilação do DNA (metiloma) de um grupo de melanomas cutâneos visando correlacionar o perfil epigenômico com (a) alterações genéticas em *BRAF*, *NRAS*, *KIT* e *TERT* (mutações de ponto), *CDKN2A*, *CDKN2B* e *CDK4* (deleções/duplicações genômicas) e (b) parâmetros clínicos e patológicos, na busca de possíveis assinaturas epigenéticas para as variáveis analisadas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Investigação de mutações de ponto dos genes *BRAF*, *NRAS*, *KIT*, e *TERT* por sequenciamento capilar.
- b) Investigação de deleções genômicas afetando *CDKN2A*, *CDKN2B* e *CDK4* pela técnica *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA).
- c) Análise do padrão de metilação da região promotora do gene *CDKN2A* e do elemento de transposição *LINE-1* por pirosequenciamento.
- d) Estudo do perfil global de metilação de DNA (metiloma) de grupo de 20 melanomas primários, 7 amostras de metástases pareadas e 3

culturas primárias de melanócitos humanos derivadas de indivíduos saudáveis, utilizando a plataforma *Illumina Infinium HD 450K Methylation Assay* (HM450K).

- e) Associação entre o status mutacional e clinico-patológico dos melanomas com o padrão de metilação de DNA para delineamento de assinaturas específicas de alterações epigenéticas.
- f) Estudo comparativo do perfil de metilação de DNA entre melanomas primários e suas metástases pareadas em subgrupo de pacientes (7 casos).
- h) Análise de expressão gênica de um conjunto de genes com padrão de metilação diferencial em região promotora, utilizando a plataforma *RT² qPCR Primer Customized Assay* (Qiagen Technologies), com o intuito de investigar o efeito da metilação aberrante na expressão gênica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este é um estudo retrospectivo baseado em amostras de 20 melanomas cutâneos primários. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Instituição (projeto nº 1765/13 – Anexo 1).

A casuística de tumores foi selecionada de acordo com os critérios descritos abaixo e conforme disponibilidade de material congelado a fresco (previamente depositado no Banco de Tumores do AC Camargo Cancer Center - ACCCC), após levantamento realizado no primeiro semestre de 2013.

3.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- i) Melanomas cutâneos primários, incluindo amostras derivadas de pacientes com e sem metástase ao diagnóstico; ii) Tecido fresco congelado para extração de DNA e RNA de alta qualidade; iii) Espessura $\geq 1\text{mm}$ (classificação T2-T4); iv) qualquer subtipo histológico (acral, nodular, extensivo superficial, lentigo maligno, desmoplásico, e outros).

3.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- i) Melanomas que não se enquadraram nos critérios de inclusão supracitados;
- ii) Tumores de pacientes com tratamento neoadjuvante.

Do grupo de 20 tumores, 7 pacientes apresentaram tecido metastático congelado a fresco, cujas amostras também foram requisitadas para este estudo.

Este trabalho foi desenvolvido em colaboração com pesquisadores do ACCCC: Dr. João Duprat Neto (Núcleo de Câncer de Pele e Dermatologia); Dra. Dirce M. Carraro (CIPE); Dr. Antônio Hugo JFM Campos (Departamento de Anatomia Patológica). Todo o material foi submetido à re-análise pelo patologista Dr. Antônio Hugo JFM Campos. As amostras de DNA e RNA dos tumores foram processadas no Laboratório de Macromoléculas vinculado ao Biobanco do ACCCC.

O Quadro 2 sumariza as principais características clínicas e anatomopatológicas dos melanomas cutâneos primários utilizados neste estudo.

Quadro 2 - Características clínicas dos pacientes e anatomopatológicas dos melanomas cutâneos primários estudados.

ID	Sexo	Idade	Raça#	Tipo histológico	TNM	Ulceração	Breslow (mm)	Infiltrado Inflamatório Intra-tumoral	Metástase Pareada
3T	F	38	Ca	Maligno ulcerado	TxN0M0	S	ND	ND	N
4T	F	77	ND	Acral lentiginoso	T2aN0M0	S	2,2	S	S
5T	M	54	Ca	Acral lentiginoso	T4bN1bM0	S	15,0	N	N
7T	M	86	Ca	Desmoplásico	T4aNxM0	N	9,0	S	N
8T	M	70	ND	Tumoral	T4bN3M0	S	11,0	S	S
12T	M	77	Ca	Acral lentiginoso	T4bN1bM0	N	30,0	N	S
13T	M	40	Ca	Acral lentiginoso	T4bN2aM0	S	4,0	S	N
15T	M	64	Ca	Nodular	T4aN1aM0	N	4,3	S	S
16T	M	4	ND	Não classificável	TxNxM0	S	ND	N	S
20T	F	84	Ca	Nodular	T4bN1bM0	S	11,0	S	N
22T	M	57	Am	Não Classificável	T4aN3M0	N	9,9	N	S
24T	M	30	Ca	Extensivo superficial	T2aN1M0	N	1,9	S	N
25T	M	69	Ca	Acral nodular	T4bN3M0	S	7,0	N	N
26T	M	79	Ca	Extensivo superficial	T2bN2bM0	S	1,8	N	N
27T	M	79	Ca	Não classificável	T4aN0M0	N	6,3	S	N
29T	M	54	Ca	Nodular	TxNxMx	ND	ND	ND	N
30T	M	78	ND	Eextensivo superficial	T4bN1bM1a	S	6,8	S	S
32T	F	82	ND	Extensivo superficial	T3bN0M0	S	2,9	N	N
33T	M	61	Ca	Desmoplásico	TxNxMx	ND	ND	ND	N
34T	F	72	Ca	Lentigo maligno	TxNxMx	S	ND	ND	N

Legendas: M= Masculino; F= feminino; #Raça auto-declarada; Ca= Caucasiano; Am= Amarelo; ND= Não descrito; S= sim; N= não

Utilizamos amostras de DNA genômico obtidas a partir de três culturas primárias de melanócitos humanos normais como condição-controle nos experimentos de metilação. Estas amostras foram obtidas por meio de colaboração com a Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler, da Escola de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, com projeto aprovado pelo comitê de ética local (CEP HU/USP 943/09). As amostras são provenientes do prepúcio de três indivíduos caucasianos (6 anos, 39 anos e o terceiro com idade indisponível).

3.3 MÉTODOS

3.3.1 Extração de DNA e RNA genômicos

DNA e RNA genômicos de amostras tumorais.

DNA e RNA genômicos de culturas primárias de melanócitos.

As amostras de DNA genômico precisaram ser purificadas devido à presença do composto polifenólico melanina. A melanina liga-se reversivelmente à enzima DNA polimerase, abolindo sua atividade catalítica (ECKHART et al. 2000). A adição de componentes como BSA (*bovine serum albumin*) em concentração de 10mM não alterou significativamente a eficiência das reações enzimáticas. Por outro lado, o tratamento das amostras de DNA com a coluna *One Step PCR Inhibitor Removal Kit* (ZYMO Research), específica para a limpeza de melanina e outros componentes polifenólicos, seguido de adição de BSA 10mM na solução da PCR, resultou na amplificação específica dos fragmentos-alvo. As amostras de RNA total

provenientes do banco de macromoléculas também apresentavam melanina, portanto a utilização do kit de limpeza para compostos polifenólicos também foi necessária.

3.3.2 Pesquisa de mutações de ponto nos genes *NRAS*, *BRAF*, *KIT* e *TERT* por sequenciamento capilar

A pesquisa de mutações em *hot-spots* dos genes *NRAS* (exon 3), *BRAF* (exon 15), *KIT* (exons 11 e 13), e *TERT* (região promotora de 146 a 124 pares de bases do início do sítio de transcrição) foi realizada por meio de sequenciamento capilar, utilizando o kit *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems), de acordo com o protocolo fornecido pela empresa. Nas reações de sequenciamento, utilizamos apenas um dos *primers* (forward ou reverse), com exceção de casos em que os resultados preliminares fossem inconclusivos. Para amplificação dos fragmentos-alvo dos genes *BRAF* e *KIT* foram utilizados *primers* do setor de diagnóstico molecular do AC Camargo Cancer Center (sequências disponíveis caso solicitadas). Para amplificar a região promotora do gene *TERT*, utilizamos *primers* disponíveis na literatura (HORN et al. 2013) *forward*: 5'- AGCACCTCGCGGTAGTGG-3', *reverse (semi-nested 1)*: 5'- CACAGCCTAGGCCGATTC-3', *reverse (semi-nested 2)*: 5'- GGGCTCCCAGTGGATTC-3'. O éxon 3 do gene *NRAS* foi amplificado a partir do seguinte par de *primers*: *forward*: 5'- GCATTGCATTCCCTGTGG-3', *reverse*: 5'- CCCTAGATTCTCAATGTCAAAC-3'.

Para as reações de amplificação das sequências-alvo, foram utilizadas as seguintes concentrações de reagentes: 0,2uM de *primers*, 0,2mM de dNTPs, 2mM de Mg, 1U de Taq polymerase (Promega) e 50ng de DNA genômico. Para amplificar a região promotora do gene *TERT*, realizamos uma *semi - nested PCR*, e as concentrações de reagentes, bem como a ciclagem, foram iguais para ambas as reações. O produto da primeira *PCR* foi diluído 10 vezes, e 1uL foi utilizado na segunda reação. As condições de ciclagem para todas as reações foram as seguintes: 95°C por 15 minutos, seguidos de 38 ciclos de 95°C por 15 segundos (30s para *TERT*), 30 segundos de anelamento (*KIT* éxon 11 e *BRAF*: 57°C; *KIT* éxon 13: 58°C; *NRAS*: 50,5°C; *TERT*: 56°C por 45s), 72°C por 45 segundos, e um ciclo final de 72°C por 10 minutos. As coordenadas genômicas das regiões-alvo, bem como as alterações investigadas, estão descritas na **Quadro 3**.

Para alinhar as seqüências obtidas com o genoma de referência (hg19; GRCh37), bem como para realizar a chamada de variantes, utilizamos o *software* CLC Genomics Workbench (Qiagen).

Quadro 3 - Mutações gênicas investigadas por sequenciamento capilar.

Gene	Coordenadas genômicas (hg19; GRCh37)	Tamanho do amplicon (pb)	Mutação
<i>BRAF</i>	chr7:140753190-140753469	279	c.1799T>A (chr7:140453136)
<i>NRAS</i>	chr1:115256276-115256675	399	c.182A>G (chr1:115256528)
<i>KIT</i>	chr4:55593582-55593708 chr4:55594177-55594287	126 110	éxon 11 (sem <i>hot spot</i>) éxon 13 (sem <i>hot spot</i>)
<i>TERT</i>	chr5:1295040-1295537	497	124, 125, 138, 139 e 146 pb de distância do sítio ATG

pb: pares de base

3.3.3 Pesquisa de deleções/duplicações genômicas nos genes *CDKN2A*, *CDKN2B* e *CDK4* por MLPA

A investigação de alterações de perdas e ganhos nos genes *CDKN2A*, *CDKN2B* e *CDK4* foi realizada utilizando a técnica MLPA, a qual consiste de uma única *PCR multiplex*. Utilizamos o kit SALSA MLPA P419 *CDKN2A/2B-CDK4* probemix (MRC Holland), seguindo o protocolo fornecido pela empresa. Este kit é composto por 14 sondas que investigam o número de cópias do gene *CDKN2A*, 8 sondas para o gene *CDKN2B*, 9 sondas para o gene *CDK4* e mais 10 sondas que flanqueiam as regiões adjacentes aos genes supracitados, além de sondas de regiões controle (sondas-controle).

A técnica de MLPA é capaz de detectar variações no número de cópias para as sequências-alvo de uma maneira semi-quantitativa, devido ao fato de que as sondas previamente hibridizadas ao DNA genômico são utilizadas como substrato para amplificação, e não o próprio DNA genômico. Os experimentos de MLPA são realizados sempre com a inclusão de amostras de DNA com número de cópias normal para as sequências avaliadas (controle-negativo), de modo que a razão entre os valores de intensidade de fluorescência de sondas provenientes das amostras investigadas e os valores de intensidade de fluorescência de sondas das amostras controle indica o número relativo de cópias na amostra testada. Neste estudo, todas as corridas de MLPA foram realizadas com pelo menos três amostras de DNA provenientes de indivíduos que sabidamente não apresentavam alterações no número de cópias dos genes *CDKN2A/2B*. Incluímos em nossos experimentos uma amostra de DNA genômico

proveniente de paciente sabidamente portador de duplicação germinativa de 9p, de segmento incluindo os genes *CDKN2A* e *CDKN2B*, utilizada como controle-positivo.

A análise dos dados foi realizada com o software Coffalyser (MRC-Holland), o qual normaliza os dados a partir de valores de intensidade de fluorêscência das sondas–controle de todos os experimentos, gerando valores médios de número de cópias para as sondas-teste, juntamente com o desvio-padrão. Em nossa análise, para calcularmos a mediana dos valores de hibridização, consideramos apenas as sondas relativas aos genes *CDKN2A* e *CDKN2B*, descartando sondas que mapeassem nas regiões adjacentes. À partir dos valores calculados, consideramos como deleção valores de mediana < 0,7, visto que o programa interpreta valores entre 0,7 - 1,3 como número de cópias diplóide ($n=2$). A **Figura 4** apresenta um relatório gerado pelo programa Coffalyser para uma das amostras testadas.

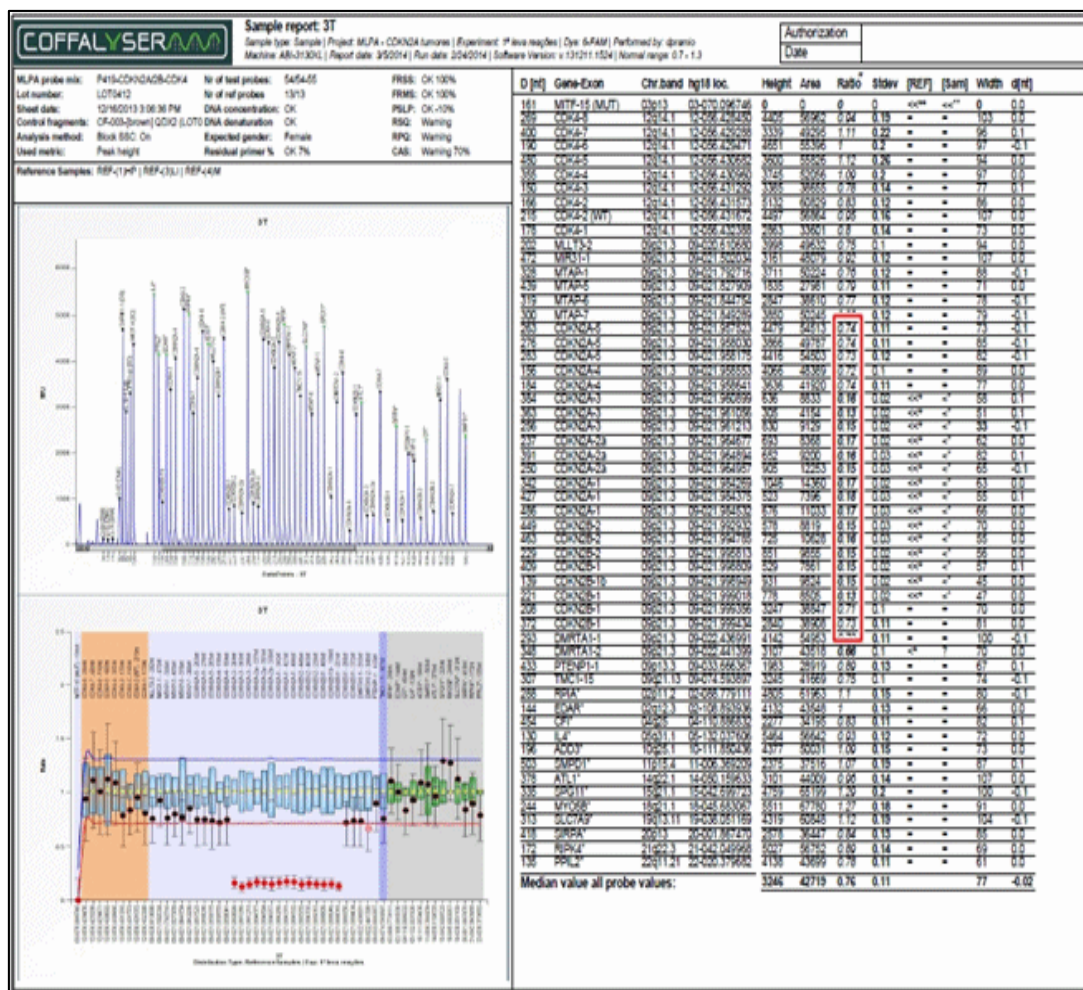
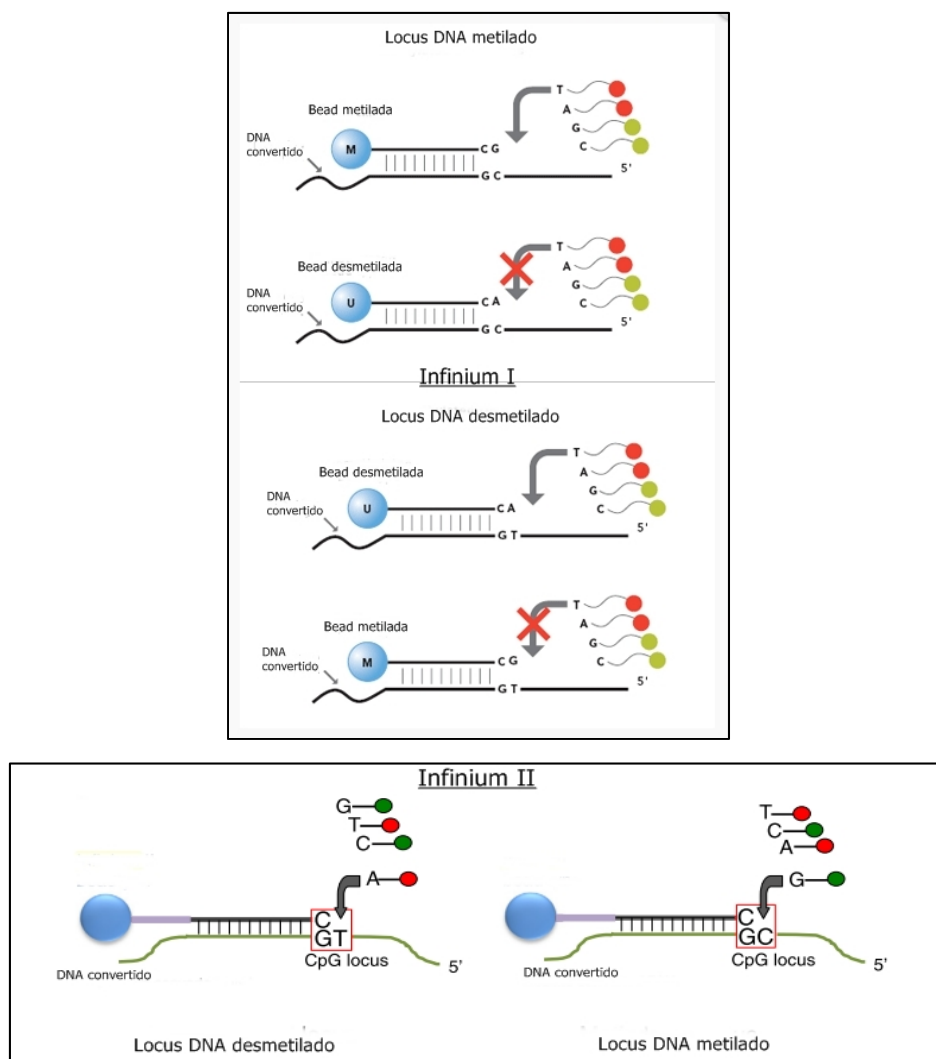


Figura 4 - Exemplo de relatório gerado pelo software Coffalyser para uma amostra analisada. No box esquerdo superior é apresentado o eletroferograma específico da corrida utilizando o kit SALSA MLPA P419 CDKN2A/2B-CDK4 probemix. Cada pico representa a quantidade de fluorescência emitida por uma sonda específica – sondas ordenadas por tamanho de fragmento genômico. No box esquerdo inferior, encontra-se o gráfico do número relativo de cópias genômicas das sequências investigadas para a amostra analisada. As barras verticais (azul claro) entre as linhas horizontais indicam a faixa de valores relativa ao número de cópias diploide para cada sonda, com os respectivos desvios padrão dos DNAs-controle testados no experimento. Cada círculo preto representa o número de cópias estimado de uma determinada sonda para a amostra analisada – sondas ordenadas de acordo com o mapeamento genômico. Neste caso, a amostra tumoral 3T apresenta uma deleção total do gene *CDKN2A*(sondas representadas por círculos vermelhos). Na coluna da direita, cada sonda deste kit está indicada em uma linha, com os respectivos valores relativos do número de cópias e desvio padrão. O valor relativo do número de cópias das sondas do gene *CDKN2A/2B* está delimitado pelo box vermelho.

3.3.4 Estudo de Metiloma utilizando a plataforma Infinium HD 450K Methylation Assay (HM450K)

O procedimento foi iniciado com uma etapa de conversão das amostras de DNA genômico por bissulfito de sódio (EZ DNA Methylation-Gold Kit, Zymo), após a qual as citosinas não-metiladas foram convertidas em uracila (U), enquanto citosinas metiladas permanecem sem modificação (C). O procedimento de hibridização das amostras de DNA convertido aos microarranjos HM450K foi realizado de acordo com as instruções do fabricante (Illumina). Brevemente, as amostras de DNA genômico convertido passaram por um processo de amplificação e fragmentação, para então serem hibridizadas às *BeadChips*, anelando-se covalentemente com sondas de 50mers por complementaridade de sequência.

Na plataforma HM450K dois sistemas distintos de detecção de sinal são utilizados: *Infinium I* e *II* (BIBIKOVA et al. 2009, 2011). A **Figura 5** ilustra o mecanismo de cada sistema. Após a hibridação, foi realizada lavagem para retirada de fragmentos não-hibridizados, e o microarranjo foi preparado para extensão de fragmentos de DNA dentro de capilares. Nesta etapa, o DNA hibridizado é usado como fita-molde para extensão de bases alelo-específicas, incorporando nucleotídeos marcados. A amplificação da marcação incorporada fornece o sinal identificado pela scanner Illumina iScan System, que excita fluoróforos a cada base, permitindo a identificação da base incorporada às réplicas de cada sonda presente no microarranjo.

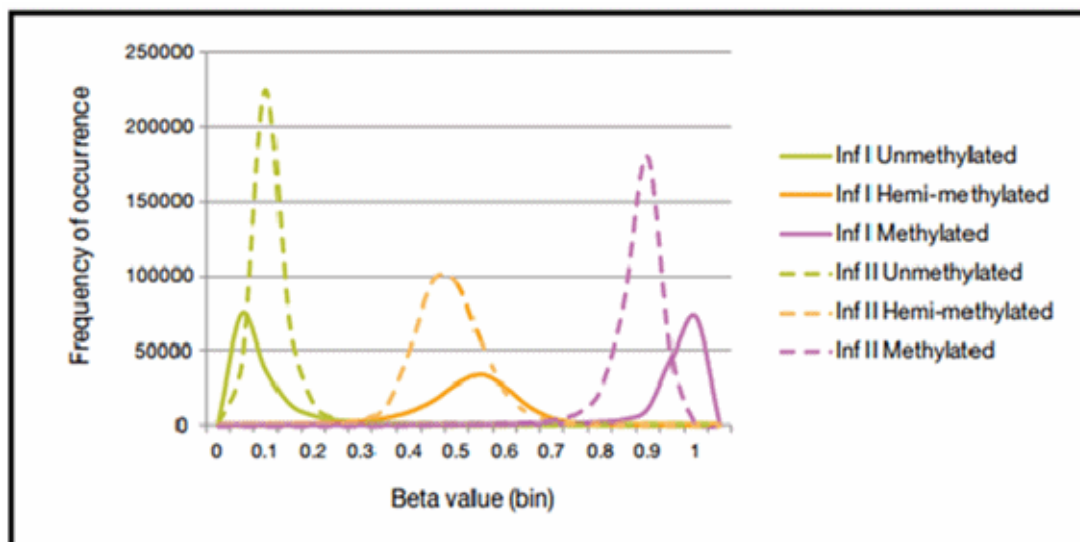


Fonte: adaptadas de BIBIKOVA et al. (2011); ILLUMINA (2015)

Figura 5 - Mecanismos de hibridização e detecção de sinal dos ensaios de metilação *Infinium I* e *II* utilizados na plataforma HM450K. Para algumas regiões genômicas, o sistema *infinium I* é utilizado: Duas sondas distintas são requeridas para interrogar uma região e a amplificação do sinal ocorre em apenas um canal de fluorescência. Se o DNA modificado possuir os CpGs metilados, ele hibridizará eficazmente apenas com a *bead* com sequência para DNA metilado. Na etapa de extensão do sinal, apenas a *bead* metilada emitirá fluorescência. Em outras regiões do genoma, o sistema *infinium II* utiliza uma única *bead* para determinar o estado de metilação do CpG específico e de outros que estiverem próximos. A hibridização entre a sonda e o DNA convertido ocorre até a citosina do dinucleotídeo CpG interrogado. Na etapa de extensão do sinal, um fluoróforo distinto será ligado à base incorporada (A para locus desmetilado, e G para locus metilado – dois canais distintos de fluorescência), indicando o status de metilação da região.

Para extração de dados dos experimentos HM450K foi utilizadoo *software Genome Studio Integrated Informatics* módulo Methylation (Illumina), que realiza a conversão do sinal de fluorescência em valores relativos de metilação para cada sítio CpG investigado (valor de β). Este *software* contém ferramentas de bioinformática para normalização, visualização e análise dos dados. O valor de β é uma medida relativa da porcentagem de metilação de determinado sítio CpG em uma amostra de DNA genômico específica, variando entre 0-1, o valor 0 indicando dinucleotídeos CpG totalmente desmetilados e 1, dinucleotídeos totalmente metilados. A distribuição dos valores de metilação (valores de β) apresenta um padrão bimodal, com a maior parte dos dinucleotídeos CpGs da plataforma podendo ser classificada em dois grupos: um deles exibe padrão de ausência ou baixa metilação, enquanto o outro grupo apresenta-se fortemente metilado.

Os dois tipos distintos de sondas Infinium I e Infinium II que compõem a HM450K geram valores de β com distribuição que apresenta pequena diferença na amplitude máxima (**Figura 6**), tanto para valores próximos a zero (CpGs desmetilados), quanto para valores próximos a 1 (CpGs totalmente metilados) (DEDEURWAERDER et al. 2011). Devido a esta particularidade, uma série de correções distintas foram propostas para realizar a normalização adequada dos sinais gerados (MARABITA et al. 2013).



Fonte: Adaptado de ILLUMINA (2014)

Figura 6 - Dois tipos diferentes de sondas contidas na plataforma HM450K (Infinium I e Infinium II), que geram uma distribuição distinta de valores de metilação (β). Gráfico mostrando a distribuição dos valores de β (medida relativa de metilação) para os 2 tipos distintos de sondas Infinium I e Infinium II presentes na plataforma. A linha cheia representa a distribuição dos valores de β para as sondas Infinium I e a linha tracejada representa a distribuição dos valores de β para as sondas Infinium II. Valores de β próximos a zero representam dinucleotídeos CpG totalmente desmetilados, enquanto que valores próximos a um representam dinucleotídeos totalmente metilados. A amplitude de distribuição dos valores de beta das sondas tipo I é maior que as sondas do tipo II.

3.3.5 Análise de metilação diferencial utilizando dados derivados de experimentos HM450K

450k Chip Analysis Methylation Pipeline (*ChAMP*)

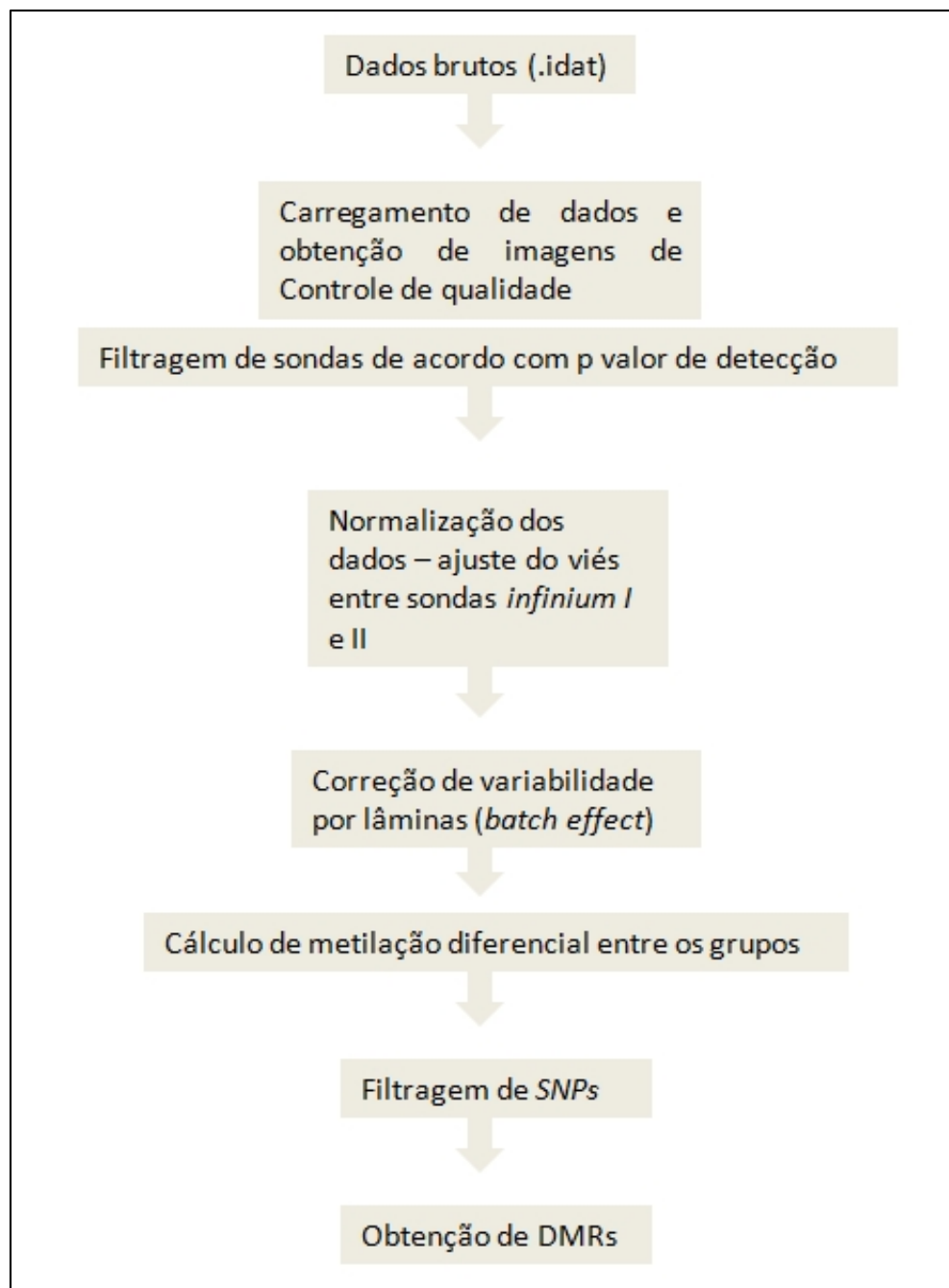
A análise de metilação diferencial foi realizada com o pacote de bioinformática *450k Chip Analysis Methylation Pipeline (ChAMP)* (MORRIS et al. 2014), executado utilizando o software gratuito R (<http://www.r-project.org/>). Foram utilizados os dados brutos obtidos pela varredura dos *BeadChips* (arquivos.idat), juntamente com um arquivo (.txt) que permite o

reconhecimento de cada amostra, classificando-as em um grupo específico para a análise posterior. A partir destes dados, uma série de análises sequenciais de bioinformática é processada de forma automática (*pipeline*). Inicialmente, ocorre a etapa de filtragem de sondas com ausência de significância estatística de detecção (valor de $p < 0,01$), bem como a exclusão de sondas mapeadas nos cromossomos X e Y (procedimento comum uma vez que tais sondas introduzem vieses na análise de amostras derivadas de ambos os sexos). Em seguida, os dados são normalizados para correção da diferença de amplitude de detecção de metilação descrita acima para as sondas Infinium I e II, através do método *Beta Mixture Quantile Dilatation* (BMIQ), e também para correção da variabilidade da eficiência de hibridização das sondas e posicionamento das amostras no microarranjo.

Após a preparação dos dados da maneira acima descrita, procede-se à análise de metilação diferencial entre grupos, cujo cálculo pode ser realizado a partir de valores de β ou de valores de M, estes últimos obtidos por meio de uma transformação logarítmica em base 2 ($\log_2$) dos valores de β (74). Com a pipeline ChAMP, a análise de metilação diferencial foi realizada a partir de valores de β . O cálculo de metilação diferencial foi feito calculando-se a diferença entre as médias dos valores de β (delta-beta - $\Delta\beta$) de cada grupo para cada uma das sondas, com um valor de p associado, utilizando o pacote *Limma*. Esta análise é baseada no método de regressão linear, com ajuste pelo método de Benjamini-Hochberg (SMYTH 2005). Nesta etapa, as sondas com SNPs mapeados em sua sequência (de acordo

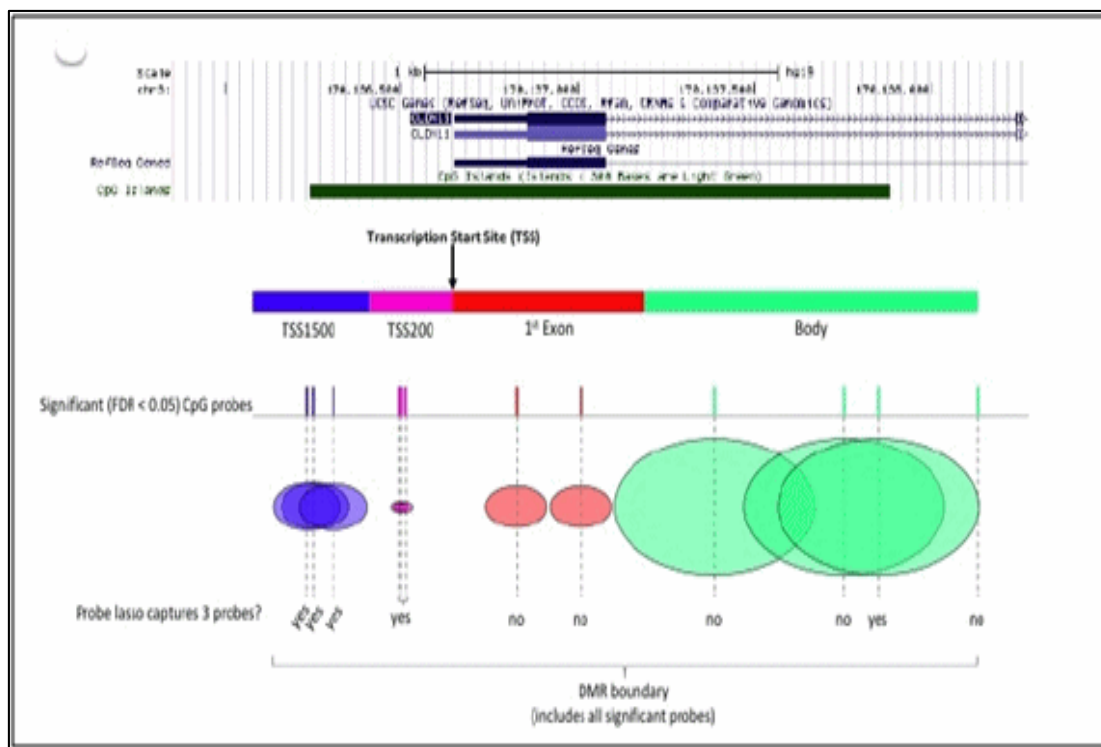
com a base de dados *1000 genome project*; <http://www.1000genomes.org/>) foram excluídas.

A análise de metilação diferencial foi realizada entre diferentes grupos constituídos de acordo com características clínicas, anatomopatológicas ou mutacionais. Esta comparação foi baseada no conceito de regiões diferencialmente metiladas (differentially methylated regions - *DMRs*). As etapas da *pipeline ChAMP*, bem como uma ilustração de DMR, encontram-se nas **Figuras 7 e 8**, respectivamente. Sondas representando sequências genômicas contíguas ou próximas (mínimo de 3 sondas, com limite máximo de distância entre duas sondas adjacentes de 1000 pares de base) com ajuste de p valor (utilizando o método de Bonferroni-Hochberg) (SMYTH 2005) $<0,05$ ou $<0,1$ foram agrupadas para constituir regiões diferencialmente metiladas (*DMRs*). Tal busca durante a análise por sondas adjacentes com valor de p ajustado significativo é dependente do contexto genômico no qual a sonda está inserida (posicionamento em ilhas CpG e posicionamento relativo ao gene). Sondas mapeadas na região promotora dos genes e em ilhas CpGs possuem maior representatividade nesta plataforma, portanto as distâncias mínima e máxima calculadas para a formação de tais *DMRs* nestas regiões (região promotora de genes e ilhas CpGs) foram menores, quando comparadas com sondas presentes em regiões intergências e no corpo de genes, por exemplo.



Fonte: Adaptado de MORRIS et al. (2014).

Figura 7 - Visão geral das etapas da pipeline ChAMP, com a qual se realiza análise de metilação diferencial para a identificação de *Methylation variable positions (MVPs)* e *Differentially methylated regions (DMRs)* entre grupos.



Fonte: Adaptado de MORRIS et al. (2014).

Figura 8 - Determinando uma região diferencialmente metilada (*Differentially Methylated Region-DMR*) utilizando a *pipeline* CHAMP. No esquema superior, encontra-se uma representação de uma região genômica pelo navegador da University of California, Santa Cruz (*UCSC genome browser*). No painel intermediário, observamos o posicionamento das sondas da plataforma HM450K, com suas posições em relação ao gene-alvo. No painel inferior, observamos a união de várias *mini-DMRs*, dando origem a uma *DMR* final, que é formada por todas as sondas dentro de seus limites.

Pipeline de bioinformática para análise de metilação diferencial desenvolvida em colaboração (*in house*)

Em uma segunda abordagem de análise de metilação diferencial, desenvolvemos uma pipeline em colaboração com o Dr. Andre Yoshiaki Kashiwabara (docente da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR), que possui grande experiência na área de programação e análise de dados de microarranjos genômicos. Primeiramente, os dados brutos foram carregados juntamente com tabelas que continham a identificação de

cada amostra e suas características clínicas, anatomopatológicas e mutacionais, o que a enquadraria em um grupo específico. Os dados foram pré-processados com exclusão de sondas com p valor de detecção $> 0,01$, sondas mapeadas em cromossomos X e Y, e sondas contendo SNPs nos sítios CpG interrogados. A etapa seguinte consistiu em normalizar os dados para corrigir o viés de utilização simultânea de sondas Infinium I e II, através do método *Beta mixture quantile dilatation (BMIQ)*, que também é utilizado pela *pipeline ChAMP*. Em seguida, os valores de β de cada sonda foram transformados em valores de M, com os quais as análises foram realizadas. Para cada amostra, os valores de M referentes a sondas mapeadas em regiões promotoras gênicas foram consolidados de maneira individual, gerando um valor de M único por promotor gênico, calculado a partir da mediana dos valores de M de cada sonda individual. Nesta etapa, utilizamos apenas sondas mapeadas na região promotora dos genes, aqui definidas como sondas localizadas em TSS1500 (1500 nucleotídeos *upstream* do sítio de início de transcrição), TSS200 (200 nucleotídeos *upstream* do sítio de início de transcrição), 5'UTR (segmento localizado a 5' da região não-traduzida) e primeiro éxon, independentemente da densidade de dinucleotídeos CpG; sondas localizadas no corpo do gene e na região 3'UTR não foram consideradas. O teste de Wilcoxon bicaudal foi utilizado para cálculo de p valor para cada gene, e este valor foi ajustado para avaliar a taxa de falsos positivos (*False Discovery Rate – FDR*), ao nível de significância $< 0,01$. Nesta análise de metilação diferencial, também obtivemos um valor de M consolidado para cada grupo a partir da mediana

dos valores de M de cada amostra do grupo; a diferença entre estes valores consolidados de M de cada grupo foi calculada, representando desta forma uma quantificação relativa de metilação diferencial da região promotora de um gene entre dois grupos. Esta *pipeline* foi empregada toda vez que dois grupos foram comparados de acordo com uma característica específica (dados clínico-patológicos ou mutacionais). A **Figura 9** representa o algoritmo da *pipeline* desenvolvida para este trabalho.

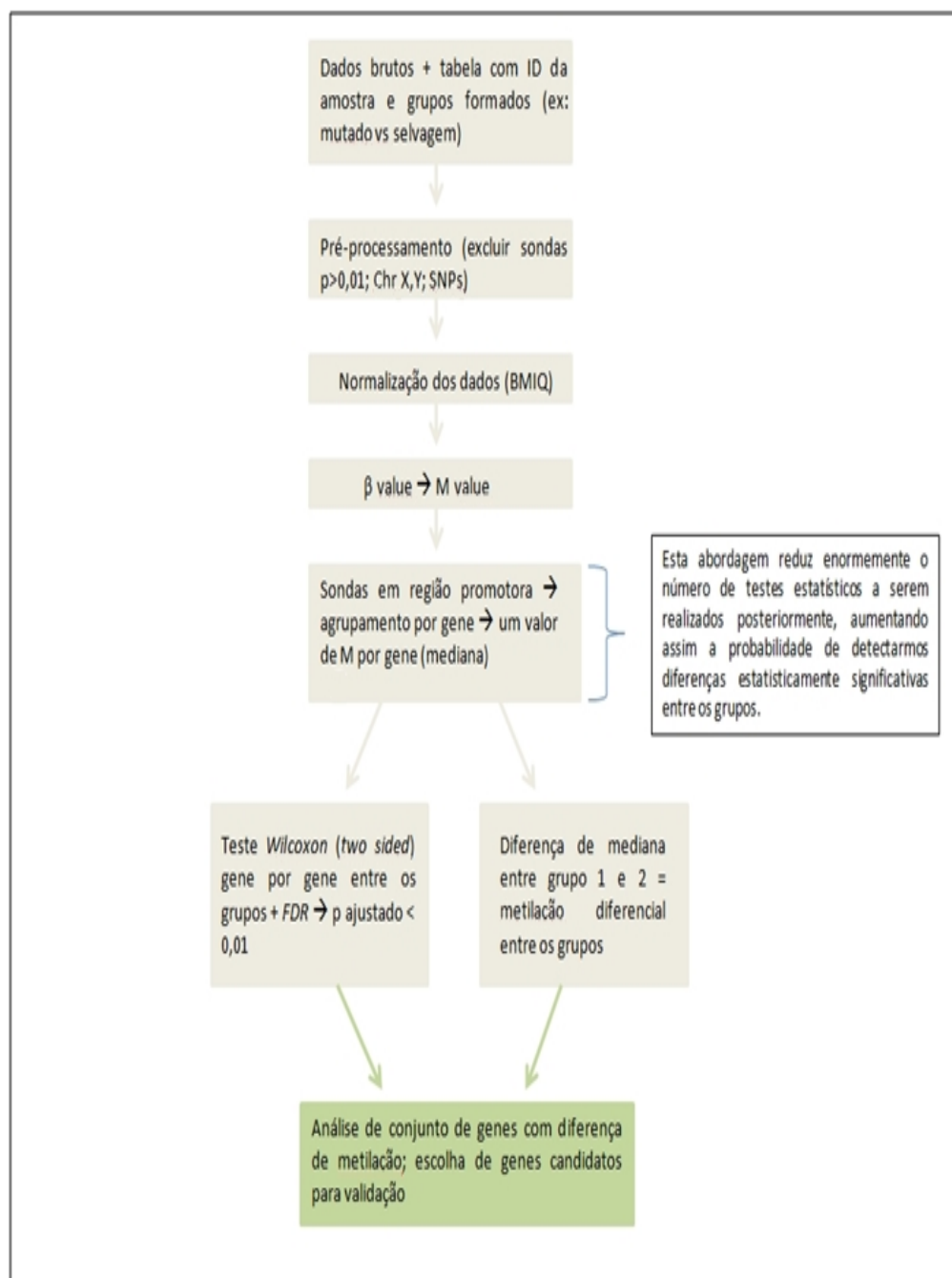


Figura 9 - Visão geral das etapas da *pipeline* desenvolvida *in house* para análise de metilação diferencial de promotores gênicos individuais entre diferentes grupos.

3.3.6 Análise de metilação de DNA por pirosequenciamento

As amostras de DNA genômico foram inicialmente tratadas com bissulfito de sódio (EZ DNA Methylation-Gold Kit, Zymo) para conversão de citosinas não-metiladas a uracila, as quais fazem pareamento com a base timina no primeiro *round* da PCR. Posteriormente seguiu-se o fluxo padrão para pirosequenciamento, de acordo com especificações do fabricante (Qiagen). Brevemente, o DNA convertido é amplificado na região-alvo através de uma PCR, sendo que um dos primers é marcado com biotina. Em uma etapa subsequente, o material amplificado é desnaturado e a fita amplificada a partir do primer biotinilado é resgatada, sendo hibridizada com um primer de sequenciamento, o qual é desenhado internamente à região amplificada pela PCR. Em seguida, o DNA marcado com biotina hibridizado com o primer de sequenciamento é incubado com as enzimas DNA polimerase, ATP sulfurilase, luciferase e apirase, além do substrato luciferina. Os desoxinucleotídeos são adicionados individualmente, sendo que a cada incorporação na fita sintetizada pela DNA polimerase, ocorre a liberação de um fosfato inorgânico em concentrações equimoleculares ao número de bases adicionadas na fita. A enzima ATP sulfurilase converte então o fosfato inorgânico em ATP na presença da adenosina 5'fosfosulfato. Por fim, a molécula de ATP possibilita a conversão da luciferina em oxiluciferina, através da enzima luciferase, com liberação de luz, a qual é captada por um detector e codificada como uma incorporação de base bem sucedida. A enzima apirase degrada então o ATP e nucleotídeos não incorporados, preparando o DNA para o próximo ciclo de sequenciamento.

Os níveis de metilação do promotor do gene *CDKN2A* e do elemento de transposição *LINE-1* foram investigados utilizando os kits PyroMark Q96 CpG p16 e PyroMark Q96 CpG LINE-1 (Qiagen Technologies), respectivamente. Os resultados foram analisados no programa PyroMark Q96 ID Software 2.5 (Qiagen), o qual gerou um pirograma para cada amostra analisada, que contém a porcentagem de metilação para cada dinucleotídeo CpG investigado na sequência. A metilação de cada CpG é mensurada por meio da razão entre T e C: uma maior porcentagem de T indica um sítio CpG pouco metilado, enquanto maior porcentagem de C indica um sítio CpG mais metilado. A partir destes valores de metilação, foi realizado o cálculo da mediana da porcentagem de metilação da sequência investigada para cada amostra.

Os valores de metilação de cada amostra (mediana) foram utilizados para comparação entre grupos definidos de acordo com as informações clínico-anatomopatológicas. Para verificar significância estatística, utilizamos o teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

3.3.7 Análise de expressão de genes candidatos diferencialmente metilados entre grupos.

Após as análises de metilação diferencial entre grupos, 6 genes foram selecionados para investigação dos níveis de expressão gênica. Os *primers* utilizados, assim como a localização cromossômica dos genes encontram-se na **Quadro 4**.

Quadro 4 - Genes selecionados para análise dos níveis de expressão do RNA mensageiro: símbolo oficial, sequências dos pares de primers e localização cromossômica

Genes (primer F ou R)		Sequência do primer 5' -> 3'	localização cromossômica
<i>HIST1H1D</i> (F)		GCCTAGGAAGCCTGCTGG	6p22.2
<i>HIST1H1D</i> (R)		CGCACTCTTGGCCACTTTC	
<i>HIST1H4D</i> (F)		GAGGAAACTCGCGGAGTG	6p22.2
<i>HIST1H4D</i> (R)		GCCGCCGAAGCCATAAAG	
<i>HIST1H3H</i> (F)		GATGGCGCTGCAAGAGGC	6p22.1
<i>HIST1H3H</i> (R)		GCGGATACGACGTGCGAG	
<i>HIST1H4F</i> (F)		GGAGAATGTGATACGGGACGC	6p22.2
<i>HIST1H4F</i> (R)		CTCAGCCACCAAAGCCGTAC	
<i>SSPN</i> (F)		CTGCTTAGTGGCCTATCTTGG	12p12.1
<i>SSPN</i> (R)		CCAGCACACAGACCGTCA	
<i>PAX8-AS1(1)</i> (F)		CCAATTACCAGGACCTCCAG	2.q13
<i>PAX8-AS1(1)</i> (R)		GTTCCAGGCACCAGCAGTC	

As amostras de RNA total provenientes do banco de macromoléculas também apresentavam melanina, portanto foi necessária a utilização do kit de limpeza para compostos polifenólicos, *One Step PCR Inhibitor Removal Kit* (ZYMO Research). O RNA total foi tratado então com a enzima DNase (DNA-free™ DNA Removal Kit – Life Technologies), seguindo o protocolo do fabricante. Em seguida, 10ng de RNA de cada amostra foram utilizados em uma PCR com primers desenhados na região intrônica do gene *MLH1* (primer F: 5'TGGTGTCTCTAGTTCTGG3', primer R: 5'CATTGTTGTAGTAGCTCTGC3'), de forma que a ausência de

amplificação na PCR (analisada através de um gel de agarose a 1%) garante a ausência de DNA genômico. Após esta confirmação, a síntese de DNA complementar (cDNA), a partir da hibridização de primers oligo(dT) ao RNA total foi realizada com o kit SuperScript® III Reverse Transcriptase (Life Technologies), de acordo com o protocolo do fabricante. Uma segunda PCR com o cDNA, utilizando *primers* desenhados em éxons distintos do gene *GAPDH* (primer F:5'GAAGGTGAAGGTCGGA3, primer R:5'GGGTCATTGATGGCAAC3') foi realizada em seguida, de modo que a amplificação de um fragmento com 102 pares de base (ausência do íntron entre os éxons) garante a conversão eficiente do cDNA.

Para as reações de *PCR* quantitativa, utilizamos o ensaio *Power SYBR green PCR Master Mix* (Life Technologies) no aparelho *7900HT Fast Real time PCR system*. As seguintes condições de ciclagem foram utilizadas: 50°C por 2min, 95°C por 10min, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 1min. Um estágio final de dissociação foi realizado, a 95°C por 15s, 60°C por 15s e 95°C por 15s. A concentração ótima de cada par de *primers* foi obtida por meio de reações (em duplicata) de amplificação variando a concentração dos primers em 200nM, 400nM e 800nM.

O cálculo da eficiência dos primers foi realizado de acordo com PFAFFL (2001), através de um conjunto de reações (em duplicata) feitas a partir de diluições seriadas (50ng-10ng-2ng-0.4ng-0.08ng) de um *pool* formado com os cDNAs de amostras tumorais utilizadas neste estudo. Um gráfico gerado a partir do valor de Ct (*Threshold cycle*) versus concentração de cDNA forneceu uma reta, a partir da qual foi extraído o valor de inclinação

desta, utilizado na fórmula $\text{Eficiência} = 10^{(-1/\text{inclinação})} - 1$. Foram utilizados apenas *primers* com eficiência igual ou superior a 0,75 (75%).

Todas as reações com amostras tumorais foram realizadas em duplicata, cada gene sendo avaliado individualmente. Utilizamos 10ng de cDNA em cada reação. Os resultados obtidos foram exportados em uma tabela para normalização de acordo com PFAFFL (2001). Cada amostra teve a média do Ct entre as duplicatas calculada, sendo a diferença máxima aceita entre os dois Cts de 0,6. Foi calculada então a diferença entre a média do Ct da amostra calibradora e as amostras testadas ($\Delta\text{Ct} = \text{Ct Calibrador} - \text{Ct amostra}$) e este valor foi elevado em uma potência relativa à eficiência de cada primer $[(1+\text{eficiência})^{\Delta\text{Ct}}]$.

Além dos genes candidatos escolhidos para análise de expressão, outros três genes foram adicionados como padrões endógenos para normalização posterior dos dados: *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), *ACTB* (actin, beta) e *HPRT1* (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1). Os níveis de expressão destes genes foram testados em todas as amostras e uma média geométrica dos valores de $2^{\Delta\text{Ct}}$ dos três genes foi calculada pelo programa geNorm (Biogazelle) (VANDESOMPELE et al. 2002). A combinação dos genes *ACTB* e *HPRT* demonstrou um maior valor de estabilidade, sendo ambos então usados para normalização dos dados (**Figura 10**).

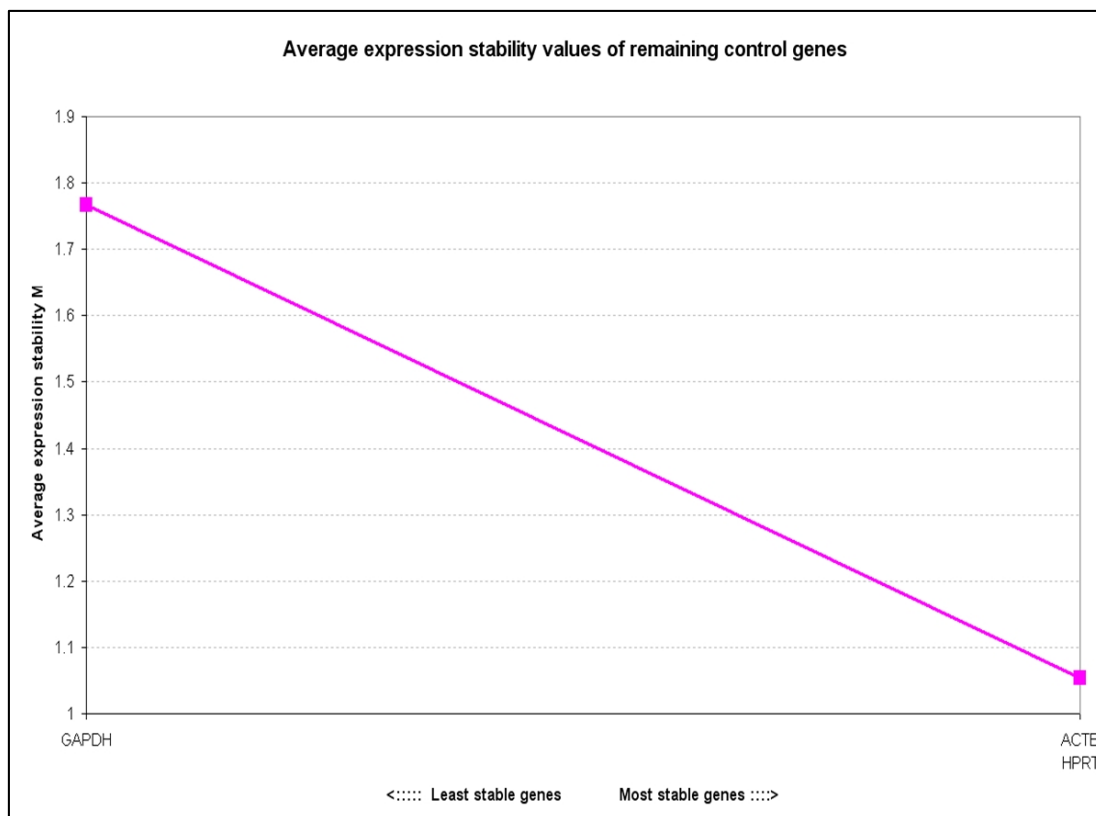


Figura 10 - Imagem do software geNorm mostrando o cálculo da estabilidade dos genes endógenos. A utilização dos 3 genes testados (*GAPDH*, *ACTB* e *HPRT*) resultou em uma média de estabilidade inadequada (valor de $M > 1,5$). A retirada do gene *GAPDH* resultou em uma combinação adequada de genes normalizadores para este estudo ($M = 1,054$).

Para o cálculo de normalização de cada amostra, obtivemos primeiramente a média do valor de $2^{\Delta Ct}$ dos dois genes normalizadores para uma dada amostra e calculamos a razão do valor de $2^{\Delta Ct}$ de um dado gene pela média de $2^{\Delta Ct}$ dos genes normalizadores.

Com os valores de expressão normalizados de todas as amostras para cada gene, calculamos em seguida a diferença de expressão entre os grupos (*fold*) formados de acordo com as características clínicas e patológicas dos pacientes, utilizando a razão entre a média dos valores de

expressão dos dois grupos. Para a verificação de associação estatística nas diferenças observadas entre os grupos, utilizamos o valor normalizado de cada amostra em $\log_2$ no teste *T de student* ($p < 0,05$) através do *software GraphPad Prism 5*.

Para calcular a correlação entre os níveis de metilação detectados para os genes selecionados e a correspondente expressão de mRNA, utilizamos o valor normalizado de expressão de cada amostra, juntamente com a mediana dos valores de β referentes às sondas mapeadas na região promotora, 5'UTR e primeiro éxon de cada gene (extraídos do *software Genome Studio*). A correlação de Spearman ($p < 0,05$) entre as duas variáveis foi calculada utilizando o *software GraphPad Prism 5*.

4 RESULTADOS

4.1 INVESTIGAÇÃO DE ALTERAÇÕES CAUSAIS RELEVANTES NO MELANOMA CUTÂNEO

4.1.1 Mutações de ponto nos genes *BRAF*, *NRAS*, *KIT* e *TERT*

O sequenciamento de regiões dos genes *NRAS*, *BRAF*, *KIT* (éxons 11 e 13) e *TERT* (promotor) frequentemente mutadas em melanoma cutâneo foi realizado para avaliar os *hot spots* desses genes em nossa casuística, além das regiões adjacentes contidas nos fragmentos amplificados. As **Figuras 11, 12, 13, 14 e 15** compilam as leituras de sequências de todas as amostras para cada gene. É possível observar que apenas as mutações mais recorrentes na literatura foram detectadas em nossas amostras tumorais. As três culturas primárias de melanócitos provenientes de indivíduos saudáveis também foram avaliadas para as mesmas mutações e, como esperado, nenhuma alteração foi identificada.

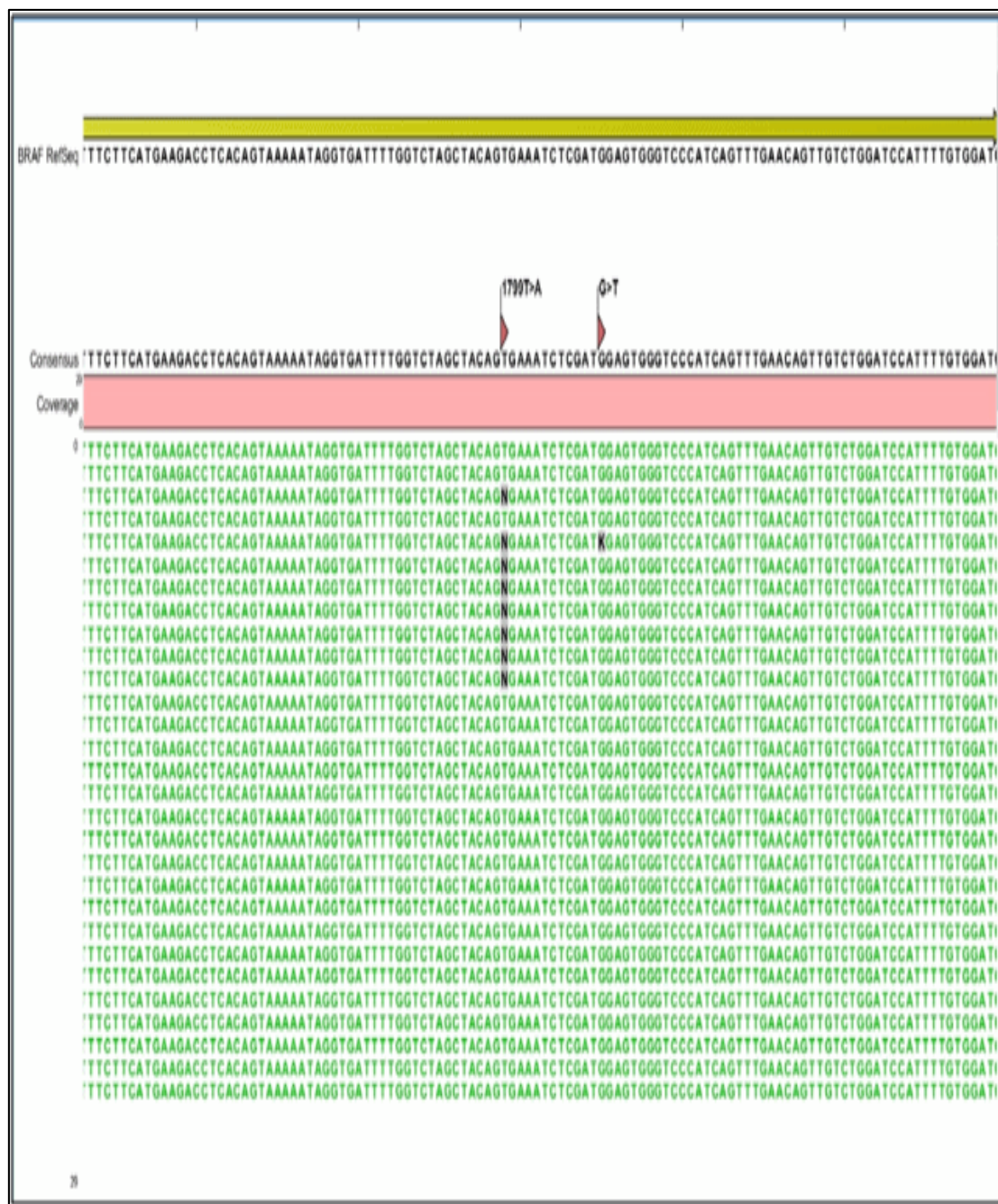


Figura 11 - Alinhamento dos sequenciamentos do éxon 15 do gene *BRAF* com a sequência de referência RefSeq Acession number NG_004333.4, utilizando o software CLC genomics workbench. A sequência em detalhe é relativa ao éxon 15 do gene *BRAF*, com a mutação 1799T>A destacada pela seta à esquerda. Na região superior da figura, a sequência RefSeq correspondente a este éxon do gene *BRAF*; na parte inferior da figura, cada linha representa o sequenciamento de uma amostra de DNA tumoral independente.

Figura 12 - Alinhamento dos sequenciamentos do éxon 2 do gene *NRAS* com a sequência de referência RefSeq Accession number NG_002524.4, utilizando o software CLC genomics workbench. A sequência em detalhe é relativa ao éxon 2 do gene *NRAS*, com a mutação 182A>N destacada pela seta. Na região superior da figura, a sequência RefSeq correspondente a este éxon do gene *NRAS*, e na parte inferior da figura cada linha representa o sequenciamento de uma amostra de DNA tumoral independente.

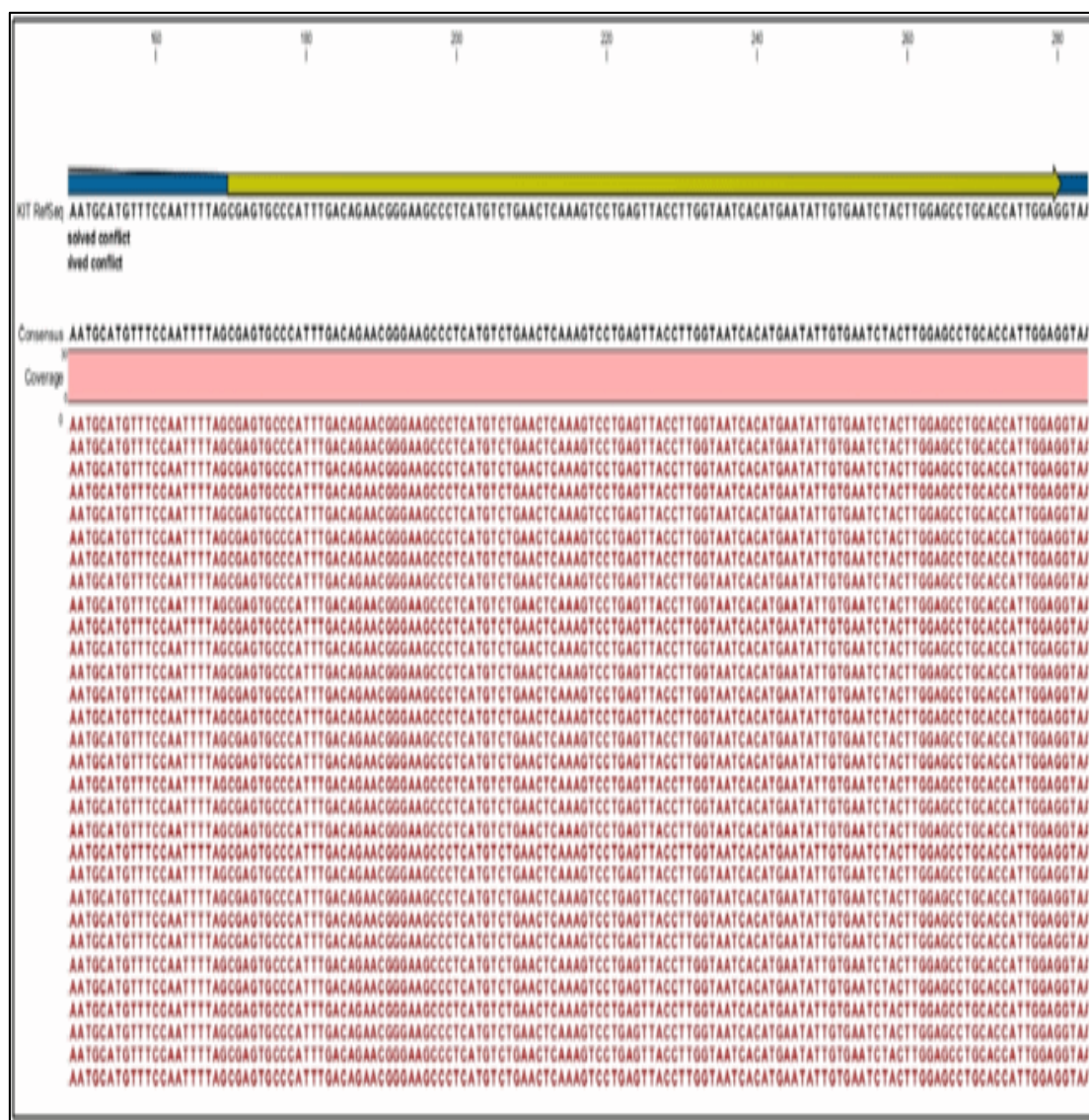


Figura 13 - Alinhamento dos sequenciamentos do gene *KIT* (éxon 13) com a sequência de referência a RefSeq Acession number NG_000222.2, utilizando o software CLC genomics workbench. A sequência em detalhe é relativa ao éxon 13 do gene *KIT*, e mutações não foram identificadas nas amostras. Na região superior da figura, a sequência RefSeq correspondente ao éxon 13 do gene *KIT*, e na parte inferior da figura cada linha representa o sequenciamento de uma amostra de DNA tumoral independente.

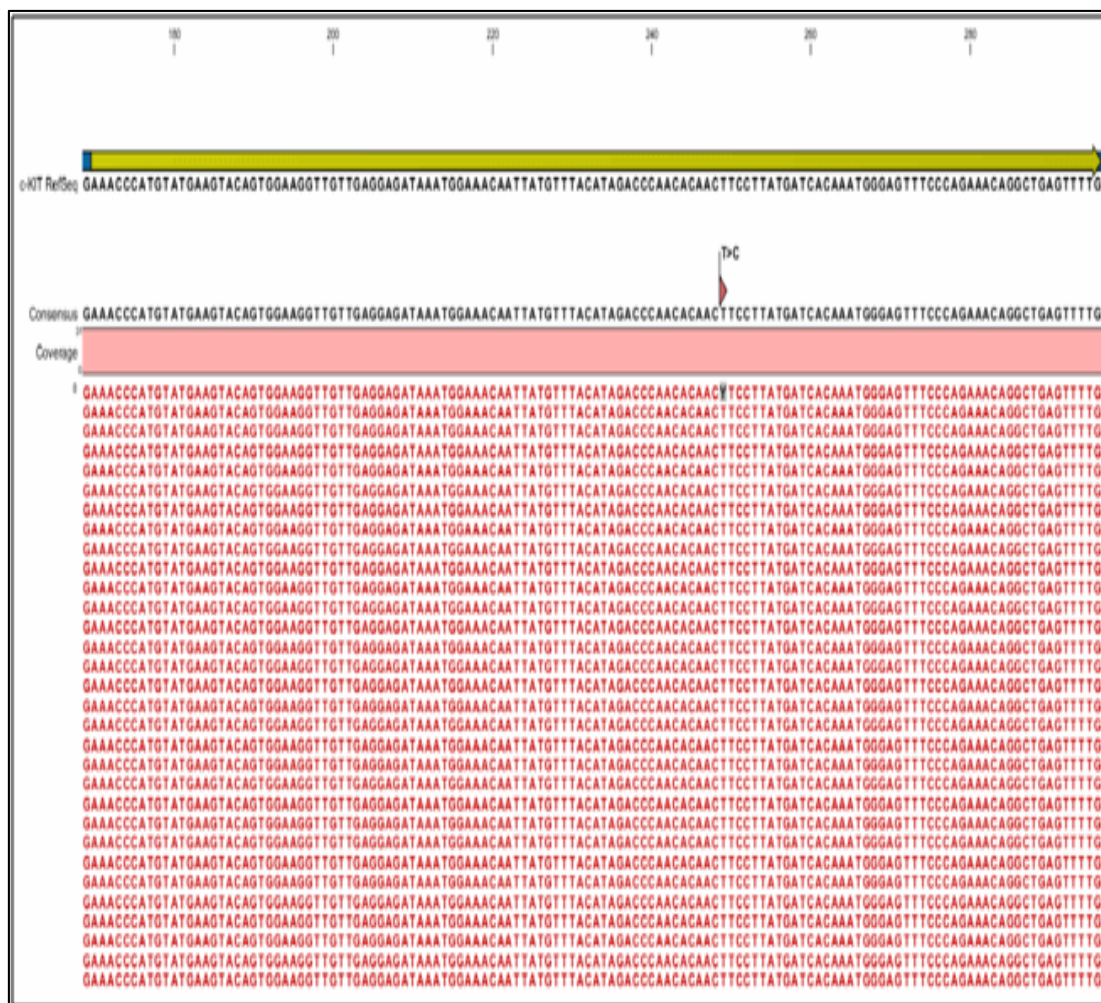
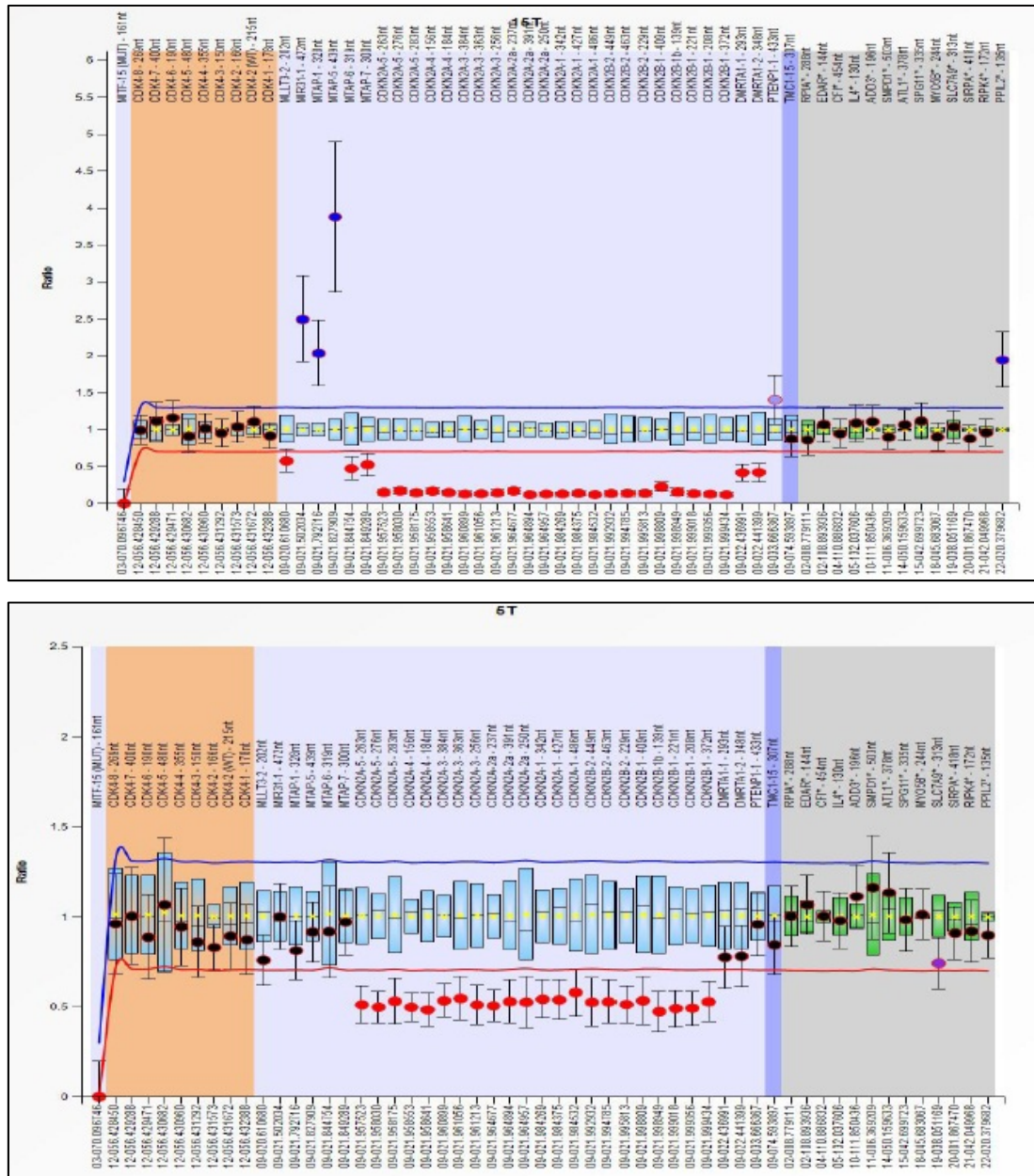
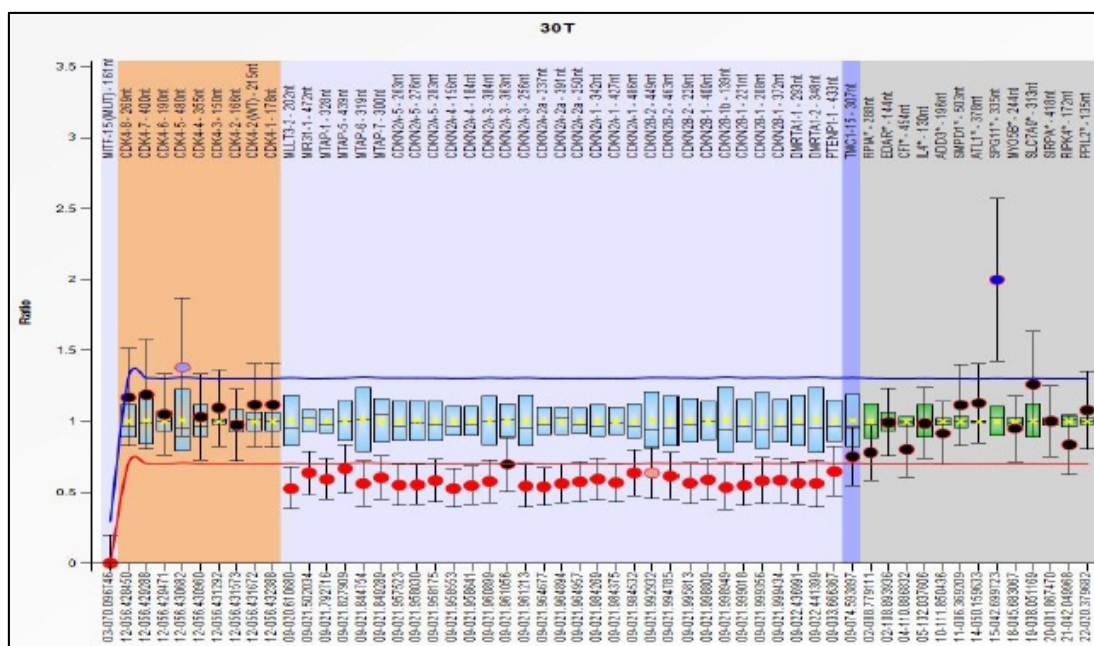


Figura 14 - Alinhamento dos sequenciamentos do gene *KIT* (éxon 11) com a sequência de referência RefSeq Acession number NG 000222.2, utilizando o software CLC genomics workbench. A sequência em detalhe é relativa ao éxon 11 do gene *KIT*, com mutação apontada pela seta. Na região superior da figura, a sequência RefSeq do éxon 11 de gene *KIT*, e na parte inferior da figura cada linha representa o sequenciamento de uma amostra de DNA tumoral independente.

Sumarizando os resultados do sequenciamento, a maioria dos melanomas primários (60%; 12/20) apresentou mutação na região promotora do gene *TERT*, 35% (7/20) são mutados em *BRAF*, 20% (4/20) são mutados para o gene *NRAS* e 5% (1/20) apresentaram mutação em *KIT*. As mutações nos genes da via MAP-quinase (*BRAF*, *NRAS* e *KIT*) foram mutuamente exclusivas.

(a) três exemplos de deleções dos genes *CDKN2A* ou *CDKN2A* e *CDKN2B*:



(b)

Figura 16 - Gráficos do número relativo de cópias das regiões gênicas investigadas para a presença de microdeleções em tumores primários. Em cada gráfico, as barras verticais (azul claro) entre as linhas horizontais indicam a faixa de valores relativa ao número de cópias diplóide para cada sonda, com os respectivos desvios padrão dos DNAs-controle testados no experimento. O eixo Y representa o número de cópias relativo para cada sonda - o valor 1 representa número de cópias diplóide. Cada círculo representa o número de cópias estimado de uma determinada sonda para a amostra analisada – sondas ordenadas de acordo com o mapeamento genômico. No primeiro gráfico (a), a amostra 26T apresenta número de cópias normal para as sondas do gene *CDKN2A*. A partir de (b), o segundo gráfico exibe dados da amostra 15T, que apresenta apenas as sondas relativas aos genes *CDKN2A/2B* deletadas em homozigose (círculos vermelhos), enquanto que 3 sondas mapeadas no gene *MTAP* estão amplificadas (círculos azuis); no terceiro gráfico, as sondas dos genes *CDKN2A/2B* indicam uma deleção em heterozigose, enquanto que no último gráfico, as sondas do gene *CDKN2A* e também sondas mapeadas em genes adjacentes, indicam uma deleção em mosaico de baixo grau.

4.1.3 Inativação do gene *CDKN2A* por metilação de promotor

Os níveis de metilação do DNA na região promotora do gene *CDKN2A* foram estimados por pirosequenciamento de um fragmento contendo sete dinucleotídeos CpGs. Os valores das medianas de metilação para os sete

CpGs de cada amostra encontram-se na **Tabela 1**. Cinco dos melanomas testados, sendo 3 tumores primários e 2 metástases, exibiram nível de metilação >25%, compatível com inativação do promotor de uma das cópias de *CDKN2A*.

Tabela 1 - Mediana do nível de metilação (%) de 7 CpGs representativos do gene *CDKN2A* nas amostras investigadas.

ID	Mediana metilação (%)	ID	Mediana metilação (%)	ID	Mediana metilação (%)
3T	0	22T	0	4M	1
4T	0	24T	6	8M	2
5T	32	25T	0	12M	26
7T	1	26T	13	15M	2
8T	0	27T	47	16M	1
12T	0	29T	0	22M	2
13T	0	30T	1	30M	57
15T	1	32T	0	CT 71	1
16T	0	33T	72	CT 87	0
20T	1	34T	3	CT 305	0

As amostras CT-71, CT-87 e CT-305 são culturas de melanócitos primários derivadas de indivíduos saudáveis.

4.1.4 Sumário da investigação de alterações genéticas e epigenéticas reconhecidamente causais no melanoma cutâneo

Considerando-se todas as alterações genéticas e epigenéticas de genes *drivers* investigados até este ponto do estudo, elaboramos um painel exibindo um sumário do perfil de tais mutações no grupo de melanomas primários (**Figura17**).

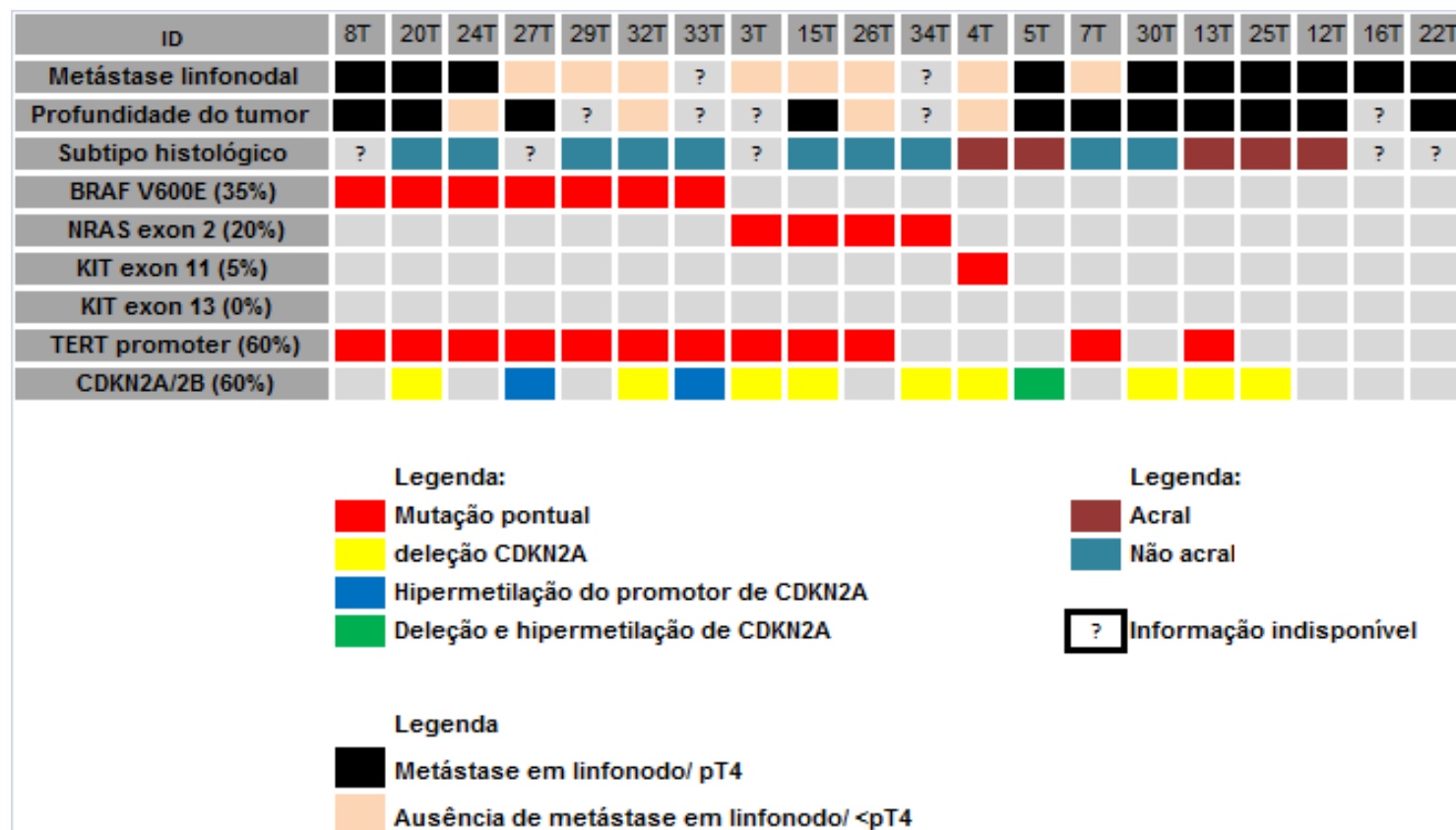


Figura17 - Espectro de mutações *drivers* nos melanomas cutâneos primários investigados. Os melanomas primários estão representados em colunas e cada linha indica uma mutação específica investigada neste estudo. São apresentados os resultados das mutações pontuais investigadas por sequenciamento, deleções no gene *CDKN2A* e o *status* de metilação da região promotora do gene *CDKN2A* investigado por pirosequenciamento. pT4: tumores com mais de 4mm de espessura. Não acral: Extensivo superficial, desmoplásico, nodular e lentigo.

Com relação aos tecidos metastáticos investigados, dois apresentaram mutação em *BRAF*, um apresentou mutação em *NRAS* e um possui mutação em *KIT*. Além das mutações em genes da via MAP quinase, três tecidos metastáticos apresentaram mutações na região promotora do gene *TERT*. Apenas um tecido metastático (15M) possui deleção do gene *CDKN2A*, a qual estava já presente no tumor primário pareado (15T), também em homozigose. As amostras metastáticas 4M e 30M apresentaram mediana de número de cópias do gene *CDKN2A* próxima a 0,7, indicando deleção em mosaicismo, enquanto que os tumores primários correspondentes (4T e 30T) apresentaram deleção em heterozigose. Ao analisarmos todas as alterações estudadas nos casos pareados, observamos divergência entre o tecido primário e a metástase em dois casos: (12T/12M), com a aquisição de hipermetilação de promotor de *CDKN2A* na metástase, e (30T/30M), com aquisição de mutações em *BRAF* e *TERT*, e ganho de metilação no promotor de *CDKN2A*. O perfil de mutações *drivers* nos tumores primários e suas respectivas metástases pareadas encontra-se na **Figura 18**.

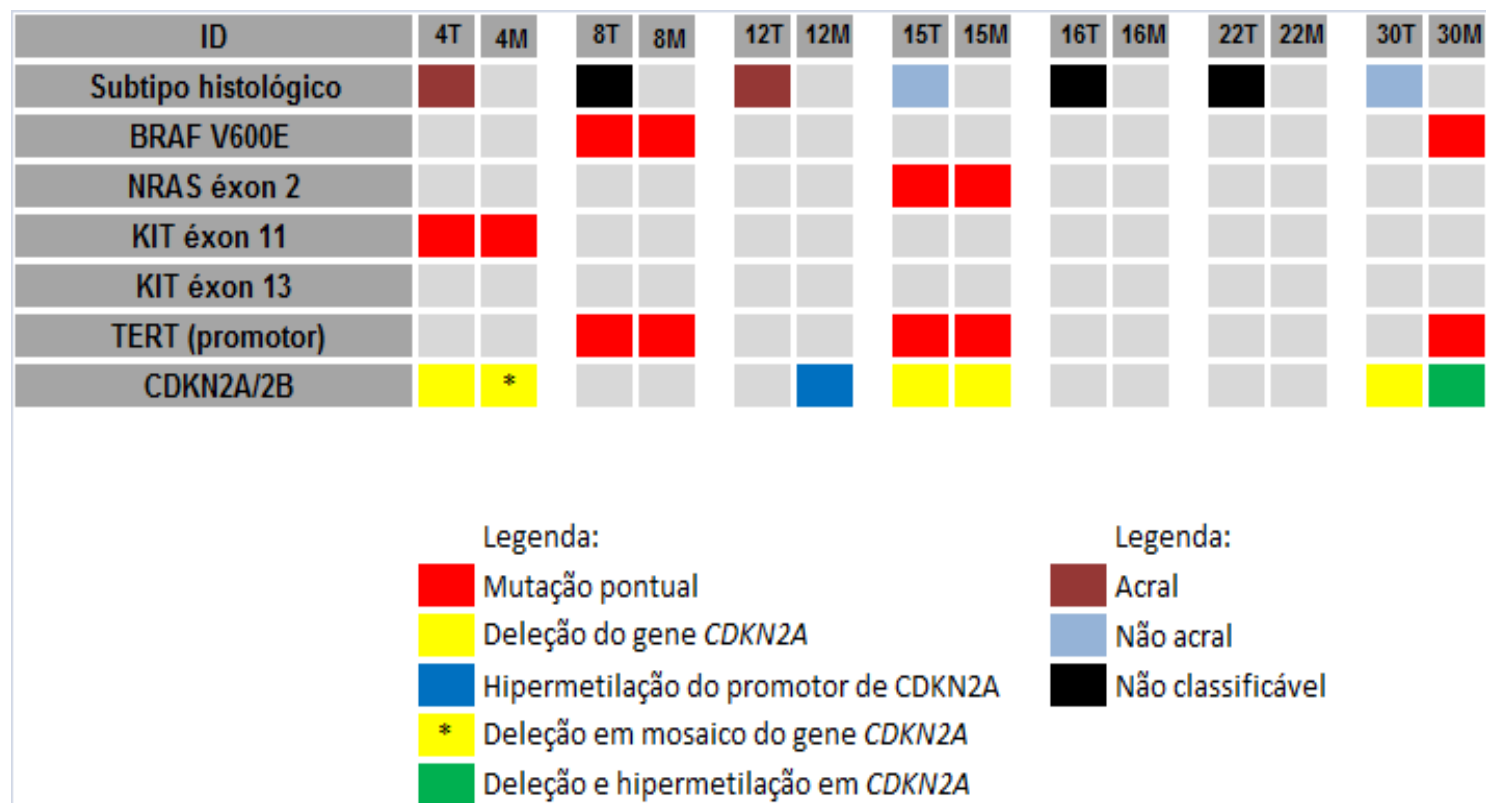


Figura 18 - **Espectro de mutações *drivers* nos melanomas primários e suas metástases pareadas.** Os melanomas primários e metástases derivadas são representados pelo mesmo número seguido pelas letras T e M, respectivamente. São apresentados os resultados das mutações pontuais investigadas por sequenciamento, deleções no gene *CDKN2A*, e o *status* de metilação da região promotora do gene *CDKN2A* investigado por pirosequenciamento.

4.2 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE METILAÇÃO DO ELEMENTO REPETITIVO *LINE-1*

O cálculo da mediana dos quatro dinucleotídeos CpG contidos na sequência *LINE-1* investigada encontra-se na **Tabela 2**, e os gráficos correlacionando a mediana dos níveis de metilação dos tumores com as características clínico-patológicas encontram-se na **figura 19**. Podemos observar que tumores mais espessos (estadiamento pT4), bem como aqueles que desenvolveram metástase à distância, exibem uma tendência à perda de metilação do elemento *LINE-1*, apesar de não atingir significância estatística.

Tabela 2 - Mediana da porcentagem de metilação de 4 CpGs representativos do elemento repetitivo *LINE-1* nas amostras investigadas.

mediana metilação					
ID	mediana metilação (%)	ID	(%)	ID	mediana metilação (%)
3T	58	22T	75	4M	67
4T	67	24T	72	8M	57
5T	79	25T	50	12M	66
7T	68	26T	63	15M	47
8T	66	27T	48	16M	68
12T	74	29T	74	22M	77
13T	69	30T	65	30M	51
15T	30	32T	68	CT-71	71
16T	67	33T	46	CT-87	74
20T	48	34T	76	CT-305	73

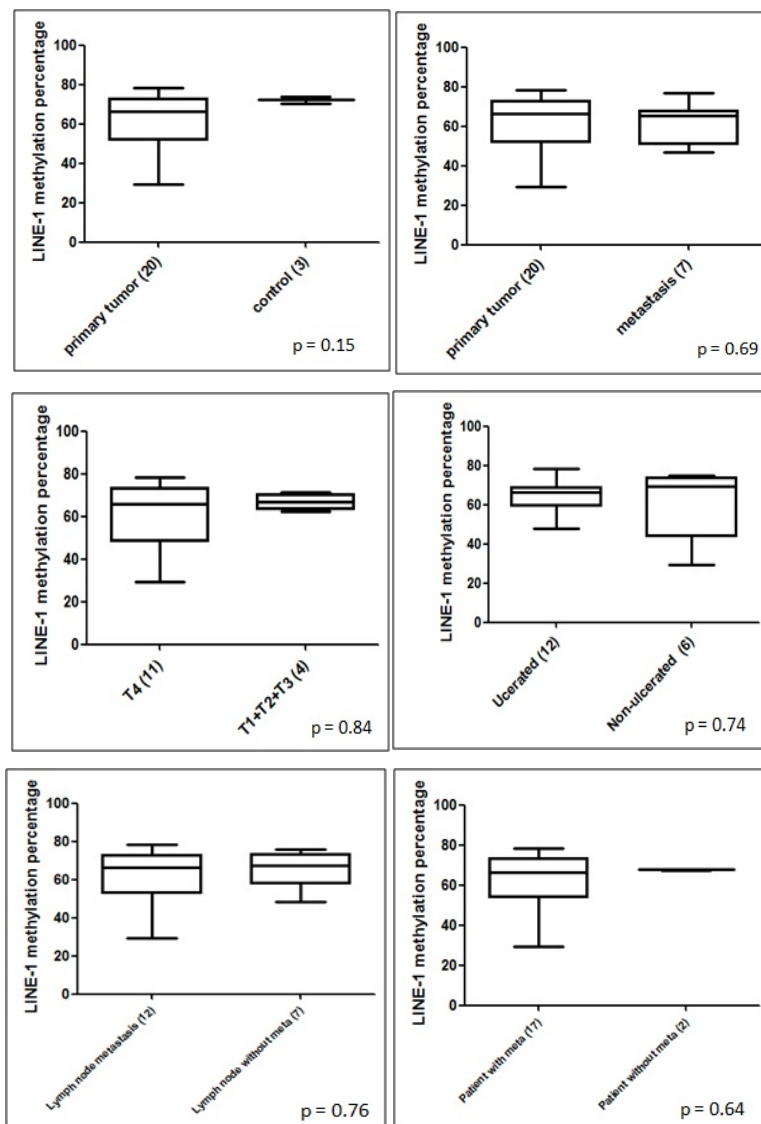


Figura 19 - Distribuição dos níveis de metilação do elemento repetitivo *LINE-1* de acordo com características clinico-patológicas dos melanomas cutâneos. Os dois primeiros gráficos comparam os níveis de metilação entre os tumores primários e os melanócitos normais, e entre os tumores primários e metástases, respectivamente. Os dois gráficos intermediários comparam os níveis de metilação entre tumores mais (T4) ou menos espessos (T1-T3) e entre tumores com ou sem ulceração. Os dois últimos gráficos comparam os níveis de metilação entre pacientes que desenvolveram ou não metástase para linfonodos ou metástase à distância, respectivamente.

Dos 20 pacientes analisados, 5 apresentaram a mediana de porcentagem de metilação de *LINE-1* menor que 50% (15T, 20T, 25T, 27T, 33T), com destaque para o paciente 15T, que apresentou uma mediana de 29,5%. Vale ressaltar que quatro dos cinco pacientes apresentaram tumores com mais que 4mm de espessura (informação indisponível para um paciente), todos portadores de alterações no gene *CDKN2A*.

4.3 PERFIL GLOBAL DE METILAÇÃO DE DNA NO MELANOMA CUTÂNEO

4.3.1 Análise de metilação diferencial entre melanomas primários e melanócitos de indivíduos controle utilizando a pipeline ChAMP

A comparação entre tumores primários e cultura primária de melanócitos normais usando a análise de metilação diferencial ChAMP identificou 174 DMRs, totalizando 890 sítios CpGs, a maioria (92%) hipermetilada nos tumores. Os sítios hipometilados nos melanomas estão associados a 9 genes, enquanto que os sítios hipermetilados estão relacionados a 105 genes. Independentemente do padrão de metilação (hiper ou hipometilação), a grande maioria das DMRs identificadas em sequências gênicas estão mapeadas em exons e introns (corpo gênico ou *gene body*, *5'UTR*, *first exon*, *3'UTR* - 60% dos eventos), excluindo regiões promotoras. Outra grande parte dos sítios CpGs diferencialmente metilados (25%) está mapeada em regiões intergênicas. A **Figura 20** esquematiza os achados dessa primeira análise, mostrando a distribuição dos sítios CpGs

que compõem as DMRs identificadas utilizando a pipeline ChAMP, de acordo com o mapeamento da sonda em relação ao posicionamento genômico. As sondas são relacionadas ao contexto gênico (região intergênica (IGR), regiões promotoras como TSS1500, TSS200, 5'UTR e primeiro éxon, corpo do gene e 3'UTR) e também à localização de ilhas CpG e consequente concentração de CpGs no segmento (associada a Ilha CpG, *Shore* CpG ou *Shelf* CpG, não associada a ilha CpG(*none*)).

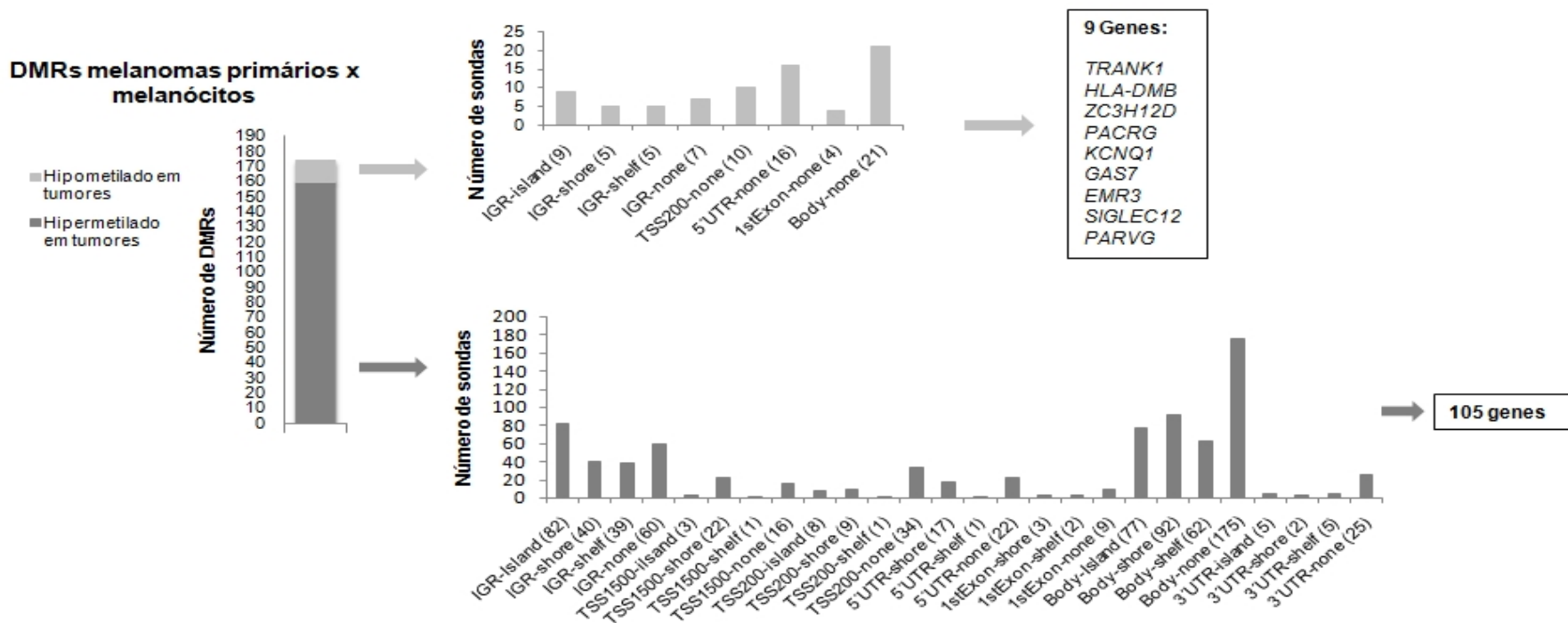


Figura 20 - Padrão de 174 DMRs identificadas entre melanomas primários e culturas primárias de melanócitos-controle e respectivos contextos genômicos e genes afetados. IGR: Região intergênica; TSS1500/200: Regiões à 1500 ou 200 pares de base do início do sítio de transcrição gênica. 5'UTR: Região 5' não traduzida; 1stExon: Primeiro éxon; Body: Corpo gênico; 3'UTR: Região 3' não traduzida; Island: ilha CpG; Shore: shore CpG (2kb de distância de uma ilha CpG); Shelf: shelf CpG (4Kb de distância de uma ilha CpG); None: Ausência de ilha CpG.

- *Co-localização de DMRs hipometiladas com elementos de transposição e elementos regulatórios*

Investigamos se as DMRs hipometiladas identificadas nos melanomas estariam co-localizadas com elementos de transposição. Em seguida, nos casos de haver associação, verificamos a presença de genes em uma distância de até 500kb à montante e à jusante da DMR associada a algum elemento de transposição, para então realizar uma análise de enriquecimento de vias biológicas utilizando o grupo de genes próximos.

Para tais análises utilizamos o navegador *UCSC Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu/>), habilitando os bancos de dados (*tracks*) referentes a elementos repetitivos, sondas presentes na plataforma HM450K e também marcação de histonas H3K27Ac (acetilação na lisina 27 da histona H3) em linhagens celulares, normalmente associada com elementos regulatórios ativos. Quatro das oito DMRs hipometiladas detectadas em regiões não codificadoras estavam associadas a elementos de transposição (LINEs, SINEs e LTRs), sendo que cada uma das DMRs apresentava 5 a 9 genes mapeados em uma distância de até 500kb. O grupo de genes associados totalizou 21: *RTP5*, *PDCD1*, *NEU4*, *THAP4*, *ATG4B*, *DTYMK*, *ING5*, *D2HGDG*, *GAL3ST2*, *QKI*, *PACRG*, *KCNQ1*, *CDKN1C*, *SLC22A18*, *PHLDA2*, *NAP1HL*, *CARS*, *EP400*, *DDX51*, *NOC4L*, *GALNT9*. No entanto, tais genes não foram relacionados com nenhuma via biológica relevante de maneira estatisticamente significativa. Uma busca por alterações destes genes no melanoma cutâneo (477 casos) na base de dados cBioPortal (<http://www.cbioportal.org/>) revelou uma frequência baixa de alterações na

maioria dos genes, enquanto que os genes *EP400*, *ATG4B*, *ING5*, e *CARS* apresentaram frequências de alterações entre 13% e 8% (**Figura 21**). Metade das DMRs hipometiladas também estava relacionada com marcação de elementos regulatórios ativos H3K27Ac (**Figura 22**).



Figura 21 - Panorama de alterações genéticas em 477 melanomas cutâneos do *The Cancer Genome Atlas* afetando 19 genes associados a regiões intergênicas hipometiladas associadas a elementos de transposição.

DMRs hipometiladas	1	2	3	4	5	6	7	8
Elemento repetitivo			■	■	■		■	
Genes próximos (500Kb)			■	■	■		■	
H3K27Ac	■		■	■	■			
lncRNA associado	■			■				

Figura 22 - Perfil de elementos genômicos e epigenômicos associados às DMRs hipometiladas em melanomas cutâneos primários. Cada bloco preto representa co-localização com o elemento discriminado.

H3K27Ac: Acetilação na lisina 27 da histona H3. lncRNA: RNAs longos não codificadores.

- *Seleção de genes com DMRs localizadas em promotor gênico e/ou ilhas CpG*

Nesta análise, selecionamos os genes de acordo com o posicionamento da DMR em relação à sequência gênica (região promotora e/ou ilha CpG), assim como de acordo com valores mínimos da diferença de metilação entre os grupos ($\Delta\beta$ mínimo de 25%), visando realizar análises de enriquecimento de vias biológicas. Também verificamos se os genes assim selecionados seriam frequentemente mutados em melanomas, de acordo com dados depositados em bancos públicos.

Apenas uma minoria do total de DMRs inicialmente identificadas pode ser selecionada utilizando o filtro descrito acima: 14% das DMRs foi identificada em regiões promotoras e/ou ilhas CpG com $\Delta\beta > 25\%$ (22 DMRs hipermetiladas e 3 DMRs hipometiladas em promotores nos melanomas). Após inspeção manual dos dados, um único gene exibindo $\Delta\beta < 25\%$ ($\Delta\beta = 10\%$) foi selecionado em virtude do número elevado de CpGs constituintes da DMR: *DNHD1*. Nas **Tabelas 3 e 4** estão indicadas estas 25

DMRs, com descrição do número de sondas e também do contexto genômico das mesmas.

Tabela 3 - Vinte e dois genes com DMRs hipermetiladas em melanomas primários, quando comparados com melanócitos normais.

Gene	Genomic feature (number of probes)	$\Delta\beta$ (median)
<i>C6orf154</i>	TSS200-island (3)	0,26
<i>SLC26A10</i>	TSS1500-island (3)	0,46
<i>REC8</i>	TSS200-island (2) + TSS1500-shore (1)	0,50
<i>HORMAD2</i>	TSS200-island (3)	0,47
<i>TWIST1</i>	TSS1500-shore (6)	0,55
<i>MIR596</i>	TSS200-shore (6) + body-shore (1)	0,39
<i>FEZ1</i>	TSS1500-shore (4)	0,34
<i>MLNR</i>	TSS1500-shore (3)	0,58
<i>ZNF358</i>	TSS1500-shore (3)	0,64
<i>MIR589</i>	TSS1500-shore + TSS200-shore (3)	0,37
<i>CD47</i>	TSS1500-shore (3)	0,41
<i>RGS12</i>	TSS1500-shelf (1) + body-shelf (7) + body-shore (1)	0,36
<i>COL11A1</i>	TSS1500-none (4)	0,51
<i>PART1</i>	TSS200-none (2) + body-none (3)	0,63
<i>CMYA5</i>	TSS1500-none (3) + TSS200-none (6)	0,48
<i>DNHD1</i>	TSS1500-none (2) + TSS200-none (4) + 5'UTR-none (4)	0,10
<i>SLC5A10</i>	TSS1500-none (3)	0,59
<i>MBP</i>	TSS200-none (6) + 5'UTR-none (2) + 1stExon-none (4)	0,45
<i>CECR1</i>	TSS200-none (5) + body-none (1)	0,62
<i>MIR1286</i>	TSS200-none (4)	0,28
<i>SUSD2</i>	TSS1500-none (2) + TSS200-none (3)	0,37
<i>KLHL31</i>	TSS200-none (3)	0,40

DMRs compostas por mínimo de 3 CpGs diferencialmente metilados, mapeados em promotor e/ou ilha CpG com diferença de metilação ($\Delta\beta$)>25%, exceto para o gene *DNHD1*. O valor de $\Delta\beta$ foi calculado como a diferença entre o valor de beta das sondas dos tumores e dos melanócitos normais, com sondas hipermetiladas nos tumores resultando em um $\Delta\beta$ positivo. Para estimarmos um único valor que represente o nível de metilação de uma DMR, calculamos a mediana dos valores de $\Delta\beta$ das sondas que formam a DMR.

Tabela 4 - Três genes com DMRs hipometiladas em melanomas primários quando comparados com melanócitos normais.

Gene	Genomic feature (number of probes)	$\Delta\beta$ (median)
<i>ZC3H12D</i>	TSS200-none (4) + 5'UTR-none (4)	-0,42
<i>EMR3</i>	TSS200-none (3) + 5'UTR-none (2)	-0,44
<i>SIGLEC12</i>	TSS200-,none (3)	-0,27

DMRs compostas por mínimo de 3 CpGs diferencialmente metilados, mapeados em promotor e/ou ilha CpG com diferença de metilação ($\Delta\beta$)>25%. O valor de $\Delta\beta$ foi calculado como a diferença entre o valor de beta das sondas dos tumores e dos melanócitos normais, com sondas hipometiladas nos tumores resultando em valores negativos de $\Delta\beta$. Para estimarmos um único valor que represente o nível de metilação de uma DMR, calculamos a mediana dos valores de $\Delta\beta$ das sondas que formam a DMR.

O conjunto de genes diferencialmente metilados foi submetido a uma análise de enriquecimento de vias biológicas mediante o uso do software gratuito WebGestalt (WANG et al. 2013), utilizando o teste hipergeométrico com a correção de Benjamini-Hochberg para testes múltiplos (p ajustado significativo < 0,05). Apenas os genes *HORMAD2* (HORMA domain containing 2) e *REC8* (REC8 meiotic recombination protein) foram significativamente enriquecidos em processos biológicos, relacionados com coesão de cromátides-irmãs (p ajustado =0,0357) e organização cromossômica durante a meiose (p ajustado =0,0357).

Utilizamos a base de dados cBioPortal (<http://www.cbioportal.org/public-portal/>) para investigar o perfil mutacional dos genes das Tabelas 3 e 4 em amostras de melanoma cutâneo (419 casos de melanoma cutâneo, provenientes do *The Cancer Genome Atlas - TCGA*). Praticamente todos os genes possuem algum tipo de alteração (expressão gênica, mutação pontual, ou alterações de número de cópias). A **Figura 23** ilustra essa análise *in silico*, mostrando a frequência de alteração genética

detectada em cada um dos 25 genes, bem como o tipo de alteração para cada amostra de melanoma investigada, de acordo com os dados do cBioPortal. Com exceção de alguns genes, como *CMYA5* (cardiomyopathy associated 5), *COL11A1* (collagen, type XI, alpha 1) e *LRRC73* (leucine rich repeat containing 73), a grande maioria apresenta alterações, embora em baixa frequência.

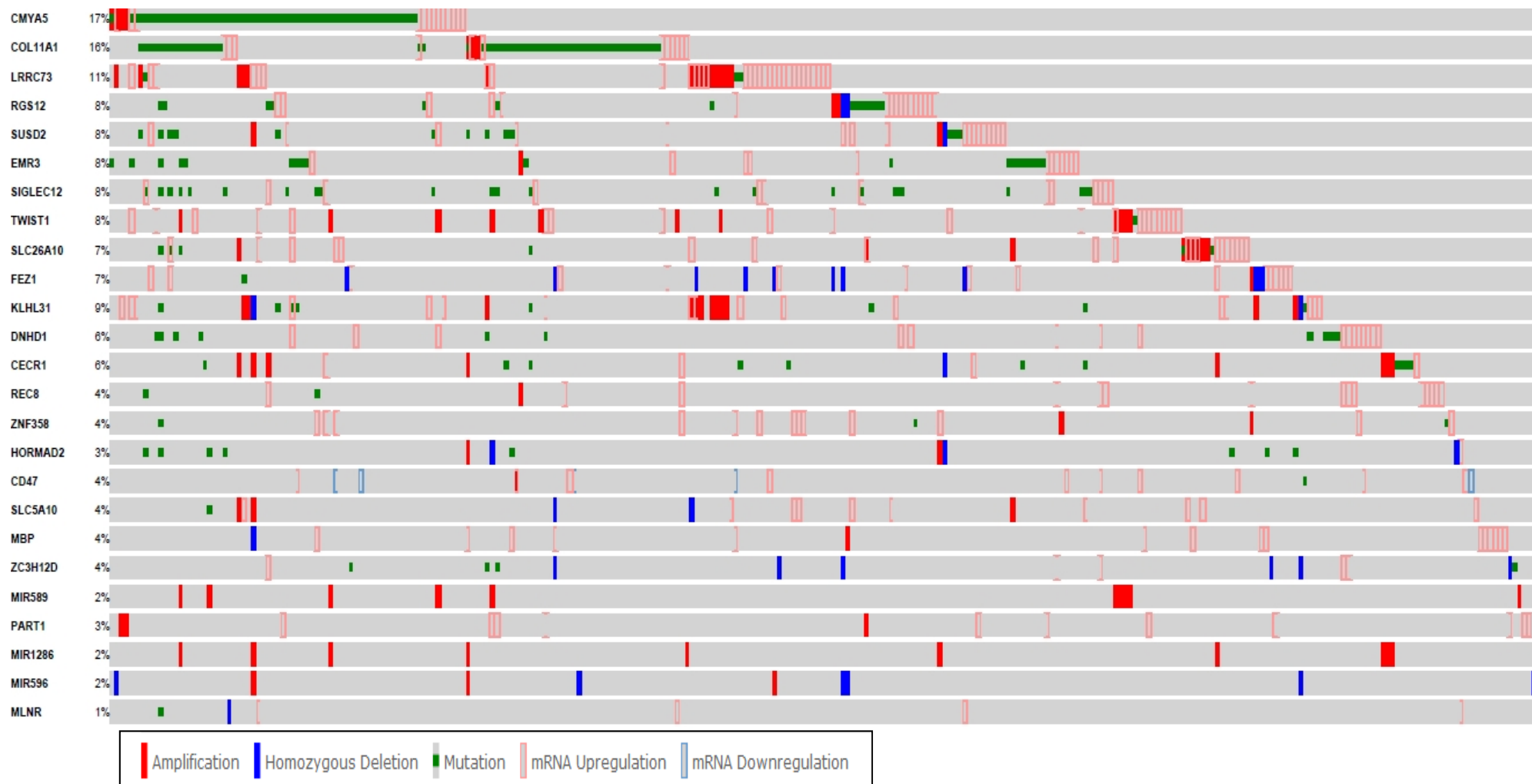


Figura 23 - Panorama de mutações genéticas em 419 melanomas cutâneos do *The Cancer Genome Atlas* afetando os 25 genes candidatos selecionados em nosso estudo por apresentarem metilação diferencial entre melanomas primários e cultura de melanócitos primários.

4.3.2 Análise de metilação diferencial entre melanomas primários e metástases utilizando a *pipeline* ChAMP

Utilizando a pipeline CHAMP, nenhum sítio CpG diferencialmente metilado foi detectado com valor de p ajustado significativo. A **figura 24** mostra a representação de cada amostra utilizando a distribuição das 1000 sondas mais variáveis e o agrupamento das mesmas em um sistema multidimensional. Como é possível observar, os tumores primários e suas metástases correspondentes (amostras pareadas tumor primário/metástase) localizam-se em proximidade em quase todos os casos. Uma possível explicação para a ausência de detecção de DMRs entre este grupos utilizando a metodologia Champ seria uma similaridade relativa em termos de perfil global de metilação do DNA.

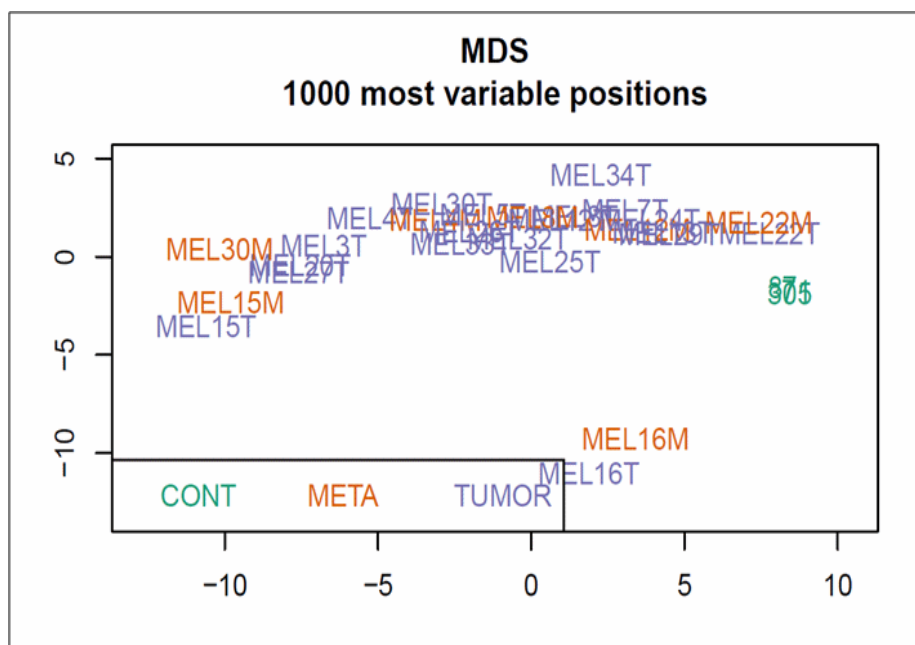


Figura 24 - Gráfico de escala multidimensional, caracterizando cada amostra de acordo com as 1000 sondas com valores de β mais variáveis na comparação entre tumores primários e metástases. Neste gráfico, cada grupo é discriminado por uma cor específica (grupos nominados no campo esquerdo inferior do gráfico). Cont: melanócitos normais (verde); Tumor: tumor primário (azul); Meta: metástase (vermelho).

4.3.3 Análise de metilação diferencial entre melanomas primários portadores de diferentes mutações drivers e de acordo com características clinico-patológicas

As comparações foram feitas entre os seguintes grupos:

- a. tumores mutados e selvagens para um dos seguintes genes: *BRAF*, *CDKN2A*, *TERT*;
- b. tumores com qualquer mutação *driver* e selvagens para os genes em questão;
- c. tumores com mutações ativadoras da via MAP-quinase (*BRAF*, *NRAS* e *KIT*) e tumores sem mutações nesta via;
- d. tumores com e sem ulceração;
- e. tumores com e sem infiltrado inflamatório;
- f. tumores com estadiamento T4 e tumores com estadiamento < que T4;
- g. tumores que desenvolveram ou não metástase para linfonodos;
- h. tumores que desenvolveram ou não metástase à distância.

Nenhuma das comparações gerou DMRs ou sítios com valor de *p* ajustado significativo, com exceção da análise entre tumores primários derivados de pacientes que desenvolveram metástase à distância e tumores primários derivados de pacientes que não desenvolveram metástase à distância (h). Nesta análise (h), 46 sítios CpGs diferencialmente metilados foram detectados, agrupados em 16 DMRs, 14 delas hipermetiladas e 2 hipometiladas em melanomas de pacientes que desenvolveram metástase, 10 delas relacionadas a genes. Novamente, a maioria das sondas diferencialmente metiladas encontrava-se no corpo da sequência gênica ou em regiões intergênicas. O único gene no qual foi detectada uma DMR em

região promotora foi *FCHSD1* (FCH and double SH3 domains 1), que se encontrava hipometilado nos tumores que desenvolveram metástase. Uma busca por alterações neste gene no cBioPortal revelou uma taxa de mutação de 6% em amostras de melanoma cutâneo. A **Figura 25** sumariza os achados desta análise (h), acima descritos.

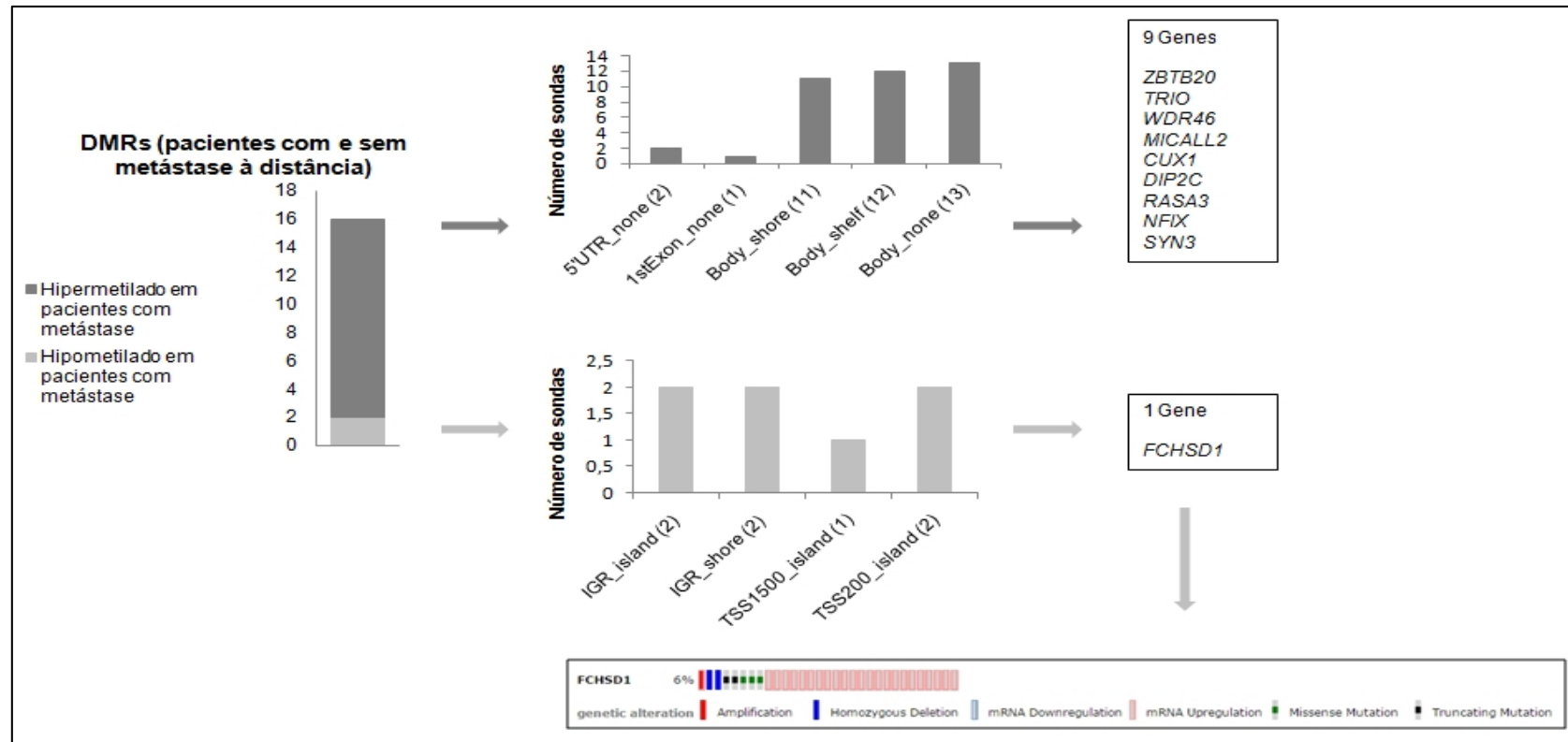


Figura 25 - Padrão de 16 DMRs identificadas entre melanomas primários que desenvolveram ou não metástase à distância. A figura mostra a distribuição dos sítios CpGs que compõem as DMRs, de acordo com o posicionamento genômico. As sondas são relacionadas ao contexto gênico (região intergênica, regiões promotoras como TSS1500, TSS200, 5'UTR e primeiro exon, corpo do gene e 3'UTR) e também à concentração de CpGs no segmento (associada a Ilha CpG, *Shore CpG* ou *Shelf CpG*, não associada a ilha CpG). O gene *FCHSD1*, hipometilado em tumores que desenvolveram metástase à distância, estava alterado em 6% das amostras de melanoma cutâneo da base de dados cBioPortal (477 amostras do *TCGA*).

Uma nova análise foi realizada com os grupos que não apresentaram DMRs anteriormente, alterando o valor de FDR (p ajustado) de 0,05 para 0,1, diminuindo desta forma a estringência da análise. Novamente, não foram identificados sítios CpG com valor de p ajustado significativo e tampouco a presença de DMRs.

4.3.4 Análise de metilação diferencial utilizando uma pipeline customizada

A *Comparação entre melanomas primários de acordo com espectro mutacional e dados clinico-patológicos*

Desenvolvemos uma segunda estratégia de análise dos dados derivados da HM450K. Nesta nova análise, as sondas representativas da região promotora de cada gene foram agrupadas para se aplicar um teste estatístico utilizando valores de metilação por gene (metodologia pag. 49).

As análises foram realizadas entre tumores primários portadores de mutações *drivers* distintas e tumores selvagens para as mesmas, além de compararmos tumores com características clinico-patológicas impactantes na progressão da doença, como subtipo histológico, índice de Breslow, presença de infiltrado inflamatório, presença de ulceração e metástase linfonodal. Também comparamos o grupo de melanomas primários e o grupo de metástases.

As comparações realizadas entre tumores com mutações *drivers* e tumores selvagens geraram um grande número de genes com regiões promotoras diferencialmente metiladas (DMRs). A **Tabela 5** sumariza o

número total de DMRs encontradas entre os grupos formados de acordo com espectro de mutações, assim como quantas DMRs teriam diferença de metilação entre grupos ($\Delta\beta$) > 10% ou >30%. Mutações nos genes *NRAS*, *CDKN2A* e mutações ativadoras da via MAP-quinase (*BRAF*, *NRAS* ou *KIT*) aparecem associadas a um número maior de eventos de hipermetilação em regiões promotoras gênicas, enquanto que amostras com mutações nos genes *BRAF* e *TERT* exibiram número maior de DMRs hipometiladas em relação aos tumores selvagens para *BRAF* e *TERT*, respectivamente.

Tabela 5 - Número de regiões diferencialmente metiladas (DMRs) em promotores gênicos entre subgrupos de melanomas primários constituídos de acordo com a presença ou ausência de uma mutação *driver* específica (genes *BRAF*, *NRAS*, *KIT*, *CDKN2A* e *TERT*).

		BRAF(n=7) x WT(n=13)	NRAS(n=4) x WT (n=16)	via MAPK(n=12) x WT(n=8)	CDKN2A(n=12) x WT(n=8)	TERT(n=12) x WT(n=8)
DMRs totais	Hipometiladas em mutados	69	33	47	433	278
	Hipermetiladas em mutados	18	195	117	424	60
	Total	87	228	164	857	338
$\Delta\beta > 10\%$	Hipometiladas em mutados	39	29	29	372	201
	Hipermetiladas em mutados	14	183	87	379	41
	Total	53	212	116	751	242
$\Delta\beta > 30\%$	Hipometiladas em mutados	4	8	1	30	19
	Hipermetiladas em mutados	1	43	13	77	8
	Total	5	51	14	107	27

Em cada coluna está sumarizado o número de DMRs encontradas nas análises de metilação diferencial comparando-se tumores primários com a mutação *driver* no gene especificado. O total de DMRs em cada análise foi filtrado para identificação dos genes com maior diferença de metilação entre os grupos ($\Delta\beta > 10\%$ e $\Delta\beta > 30\%$).. Via MAPK: amostras mutadas em um ou mais dos seguintes genes: *BRAF*, *NRAS* e *KIT*.

Na análise de metilação diferencial entre tumores primários agrupados de acordo com suas características clínicas e patológicas, os melanomas primários apresentaram um pequeno número de DMRs quando comparados com os tecidos metastáticos, todas com pequena diferença nos valores de metilação entre os grupos, resultado concordante com a análise realizada com a pipeline ChAMP. O grupo de melanomas do subtipo histológico acral (n=5) e tumores com presença de infiltrado inflamatório (n=9) apresentaram maior número de DMRs hipermetiladas, quando comparados com tumores não-acrais e sem infiltrado inflamatório, respectivamente. Melanomas derivados de pacientes que desenvolveram metástase linfonodal (n=12) apresentaram padrão de hipometilação na maioria das DMRs, enquanto que tumores com ulceração e tumores mais espessos apresentaram metade de suas DMRs hipometiladas e a outra metade hipermetilada, quando comparados a tumores sem ulceração e tumores mais finos, respectivamente. A **Tabela 6** sumariza os achados desta etapa.

Tabela 6 - Número de regiões diferencialmente metiladas (DMRs) em promotores gênicos entre subgrupos de melanomas primários constituídos de acordo com características clínicas e patológicas.

		Acral(n=5) x Não-acral(n=15)	pT4 (n=11) x pT2,pT3 (n=4)	Infiltrado inflamatório (presente(n=9) x ausente(n=7))
DMRs totais	Hipometiladas*	10	67	79
	Hipermetiladas*	101	53	137
	Total	111	120	216
$\Delta\beta > 10\%$	Hipometiladas*	5	34	70
	Hipermetiladas*	71	27	110
	Total	76	61	180
$\Delta\beta > 30\%$	Hipometiladas*	2	2	7
	Hipermetiladas*	8	2	20
	Total	10	4	27
		Metástase linfonodal (presente(n=12) x ausente(n=7))	Melanoma primário(n=18) x metástase(n=7)	Ulceração (presente (n=12) x ausente(n=6))
DMRs totais	Hipometiladas*	289	8	99
	Hipermetiladas*	9	1	102
	Total	298	9	201
$\Delta\beta > 10\%$	Hipometiladas*	216	4	42
	Hipermetiladas*	3	0	93
	Total	216	4	135
$\Delta\beta > 30\%$	Hipometiladas*	12	0	7
	Hipermetiladas*	1	0	10
	Total	13	0	17

Em cada coluna está sumarizado o número de DMRs encontradas comparando-se tumores primários com as características discriminadas. O total de DMRs em cada análise foi filtrado para identificação dos genes com maior diferença de metilação entre os grupos ($\Delta\beta > 10\%$ e $\Delta\beta > 30\%$). *A condição de metilação refere-se aos melanomas acrais; pT4; que apresentam infiltrado inflamatório; que apresentam metástase linfonodal; aos melanomas primários, e melanomas ulcerados.

Selecionamos nos resultados baseados em critérios clínicos e patológicos apenas as DMRs com $\Delta\beta > 10\%$ (hiper e hipometilação) para análise de enriquecimento de vias biológicas, utilizando o software gratuito WebGestalt (WANG et al. 2013). A comparação entre melanomas do subtipo acral e demais cutâneos revelou enriquecimento de genes relacionados a processos do sistema imune, enquanto que a comparação entre melanomas T4 versus melanomas <T4 revelou enriquecimento de vias de crescimento celular. Já as DMRs identificadas nos melanomas com ulceração demonstraram enriquecimento em genes relacionados à migração celular. A **Tabela 7** sumariza os processos biológicos significativamente associados com as DMRs.

Tabela 7 - Análise de enriquecimento de processos biológicos utilizando o grupo de genes associado às DMRs exibindo $\Delta\beta > 10\%$ obtidas na comparação de grupos de melanomas classificados de acordo com características clínicas e patológicas.

Subgrupo	Processos biológicos enriquecidos por DMRs	Razão de enriquecimento	p ajustado
Subtipo histológico	Resposta imune humoral	13,76	0,0002
	Imunidade mediada por célula B	10,25	0,0046
Profundidade do tumor	Crescimento celular	6,74	0,0072
Metástase linfonodal	Morfogênese de órgãos	3,75	4.14e-06
	Desenvolvimento de cartilagens	7,08	0,0001
	Ligação ao DNA em sequências específicas	3,78	4.17e-06
Ulceração	Migração celular	3,41	9.42e-05
	Ligação ao DNA em sequências específicas	5,32	0,0015

- *Análise de expressão gênica*

Na análise manual do grupo de DMRs afetando regiões promotoras gênicas e com maior diferença de metilação entre os grupos ($\Delta\beta > 30\%$), inspecionamos os valores de metilação de cada amostra individual. Esta análise teve por finalidade identificar DMRs que exibissem a menor sobreposição possível entre os valores de metilação de cada grupo testado, ou seja, DMRs para as quais a separação no padrão de metilação fosse mais nítida entre os grupos comparados. A **Figura 26** exemplifica os critérios dessa seleção para um dos genes, *SSPN* (sarcospan). identificamos enriquecimento de um perfil de hipermetilação de promotor em tumores com mutações no gene *TERT*, quando comparados com tumores selvagens para o mesmo gene, evidenciado no gráfico com as amostras de cada grupo representadas individualmente.

Figura 26 - Padrão de metilação do DNA em sítios CpG mapeados na região promotora do gene *SSPN* em melanomas primários portadores ou não de mutação no promotor do gene *TERT*. No gráfico, cada linha contínua representa uma amostra tumoral: em vermelho, melanomas portadores de mutação no promotor do gene *TERT*(n=12); em azul, amostras selvagens quanto a mutações neste gene (n=8). No eixo X estão representadas a cada espaçamento uma sonda da plataforma HM450K interrogando um sítio CpG mapeado na região promotora do gene *SSPN*. No eixo y estão os valores de metilação (beta-values) que variam entre 0 (ausência de metilação) e 1 (totalmente metilado). Imagem extraída do software Genome Studio.

Seis genes foram assim selecionados para avaliação quanto ao padrão de expressão gênica, visando investigar uma possível associação entre regulação da expressão gênica e alteração do nível de metilação na região promotora. A **Tabela 8** apresenta os genes selecionados para análise de expressão, juntamente com a descrição do tipo de comparação no qual a diferença de metilação foi detectada e os valores dessa diferença.

Tabela 8 - Genes selecionados para análise da expressão de mRNA.

Gene	Subgrupo	Padrão de metilação detectado	Presença de ilha CpG no promotor	Δ ₀
<i>HIST1H1D</i>	<i>BRAF</i>	Hipometilado	Sem ilha CpG	-2,41
<i>SSPW</i>	<i>TP53</i>	Hipermetilado	Shelf, Shore e ilha CpG	2,37
<i>HIST1H4D</i>	<i>CDKN2A</i>	Hipermetilado	Shore CpG	2,43
<i>HIST1H3H</i>	Acral x Não Acral	Hipermetilado	Shore CpG	2,33
<i>PAX8-AS1</i>	Metástase linfórtica	Hipermetilado	Shore e ilha CpG	2,3
<i>HIST1H4F</i>	Melanomas pT4	Hipermetilado	Shore CpG	2,35

Para cada gene analisado, utilizamos apenas as amostras que possuísem a informação relativa à característica clínico-patológica ou mutacional requerida, com cDNA de boa qualidade - as amostras 22T e 26T foram excluídas destas análises devido a má qualidade do cDNA.

Para o gene *HIST1H1D* (histone cluster 1, H1d), hipometilado na região promotora em tumores mutados em *BRAF*, o cálculo de diferença de expressão foi realizado entre as amostras: 8T, 20T, 24T, 27T, 29T, 32T, 33T (mutados para *BRAF*) e 3T, 4T, 5T, 7T, 12T, 13T, 15T, 16T, 25T, 30T, 34T (selvagens para *BRAF*). Detectamos aumento de expressão do gene *HIST1H1D* (fold 2,63)

no grupo de tumores mutados *BRAF* (hipometilados), resultado com tendência à significância estatística ($p= 0,057$). Detectamos correlação negativa entre a expressão do gene *HIST1H1D* e os níveis de metilação na região promotora ($r=-0,67$), resultado estatisticamente significativo ($p=0,002$) (**Figura 27**).

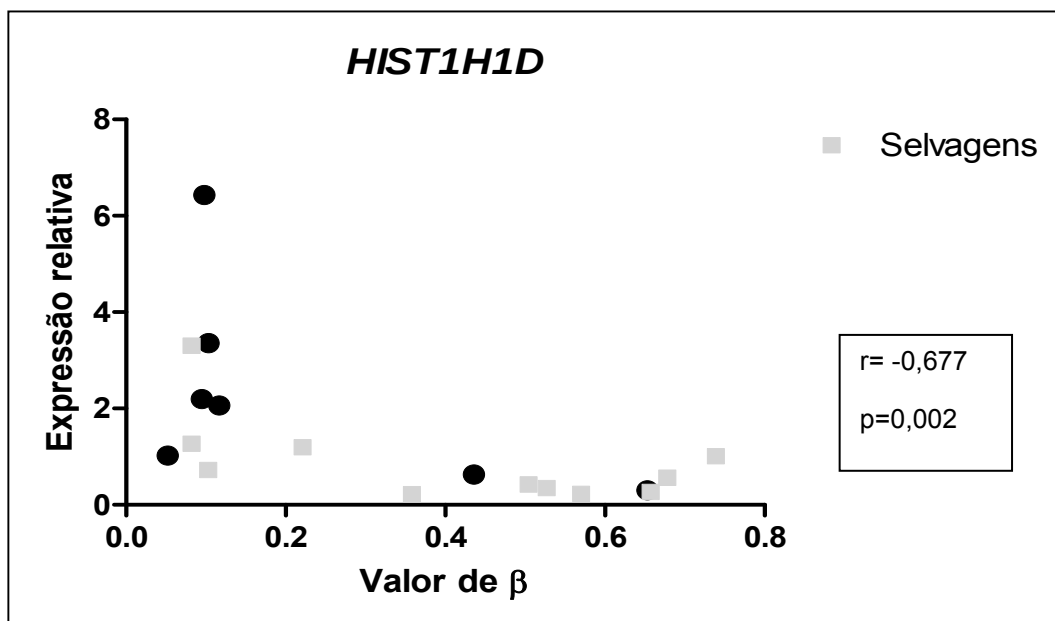


Figura 27 - Gráfico de correlação entre a expressão relativa do gene *HIST1H1D* e os níveis de metilação detectados em sua região promotora. Neste gráfico, cada ponto representa uma amostra analisada. Retângulos cinzas representam o grupo de pacientes selvagens para mutação em *BRAF*, enquanto círculos pretos representam pacientes mutados em *BRAF*.

Para o gene *HIST1H3H* (histone cluster 1, H3h), hipermetilado na região promotora em tumores acrais, a diferença de expressão foi calculada entre as amostras 4T, 5T, 12T, 13T, 25T (subtipo histológico acral) e 7T, 8T, 15T, 16T, 27T, 29T, 30T, 32T, 33T (subtipo não acral) – as amostras 3T e 34T foram excluídas pois as reações de amplificação do cDNA foram inespecíficas. O

gene *HIST1H3H* apresentou hiperexpressão de aproximadamente 1,65 vezes em amostras de qualquer subtipo histológico que não fosse acral (amostras hipometiladas), resultado não significativo ($p= 0,081$). Detectamos correlação negativa entre a expressão do gene *HIST1H3H* e os níveis de metilação na sua região promotora ($r= -0,38$), mas este resultado não apresentou significância estatística ($p=0,179$) (**Figura 28**).

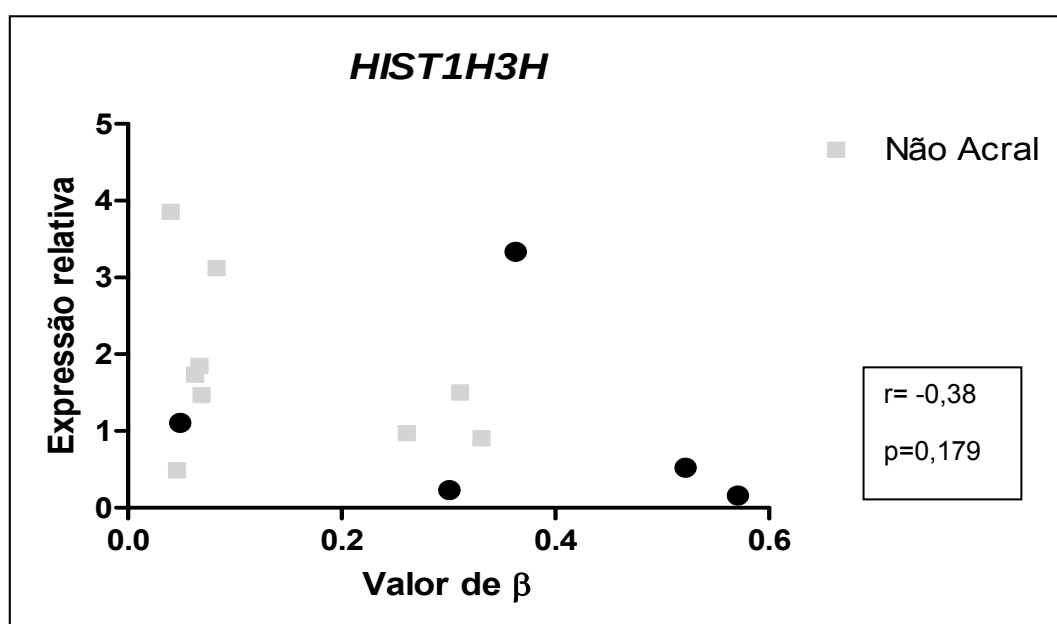


Figura 28 - Gráfico de correlação entre a expressão relativa do gene *HIST1H3H* e os níveis de metilação detectados em sua região promotora. Neste gráfico, cada ponto representa uma amostra analisada. Retângulos cinzas representam o grupo de pacientes de subtipos histológicos não acrais, enquanto círculos pretos representam pacientes do subtipo histológico acral.

Para o gene *HIST1H4D* (histone cluster 1, H4d), hipermetilado na região promotora em tumores mutados para *CDKN2A*, a diferença de expressão foi calculada entre as amostras 7T, 8T, 12T, 16T, 24T, 29T (selvagens para *CDKN2A*) e 3T, 4T, 5T, 13T, 15T, 20T, 25T, 27T, 30T, 32T, 33T (mutadas para

CDKN2A). O gene *HIST1H4D* estava aproximadamente 1,1 vezes mais expresso em tumores mutados em *CDKN2A* (hipermetilados), resultado sem significância estatística ($p=0,45$). Da mesma maneira, embora a correlação entre a expressão do gene *HIST1H4D* e os níveis de metilação da sua região promotora tenha sido negativa e moderada ($r=-0,428$), este resultado não apresentou significância estatística ($p=0,085$) (**Figura 29**).

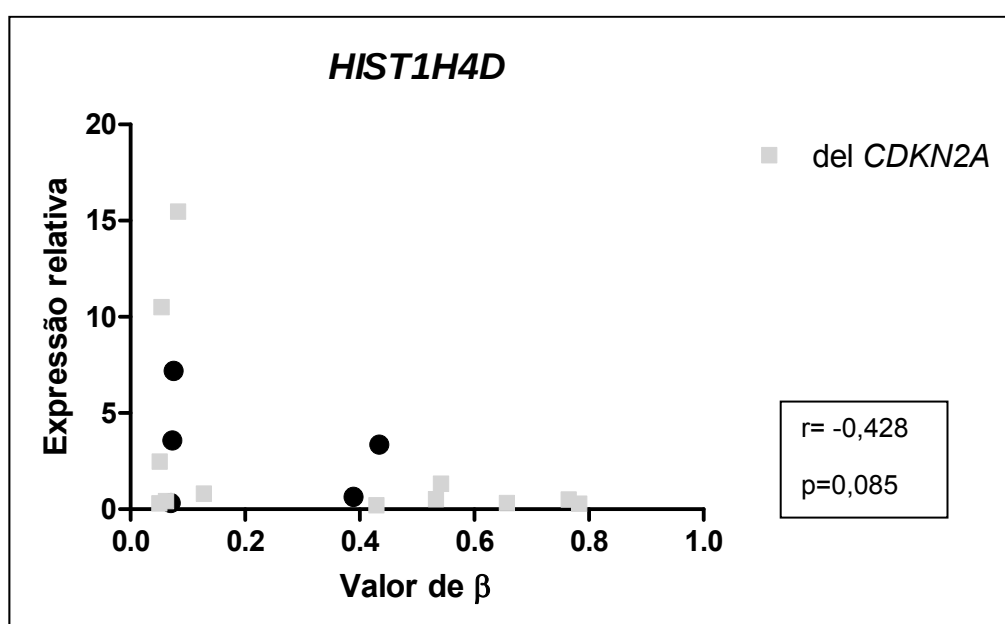


Figura 29 - Gráfico de correlação entre a expressão relativa do gene *HIST1H4D* e os níveis de metilação detectados em sua região promotora. Neste gráfico, cada ponto representa uma amostra analisada. Retângulos cinzas representam o grupo de pacientes com alterações em *CDKN2A*, enquanto círculos pretos representam pacientes selvagens para *CDKN2A*.

Para o gene *HIST1H4F* (histone cluster 1, H4f), hipermetilado na região promotora em amostras com mais de 4mm de espessura, a diferença de expressão foi calculada entre as amostras 4T, 24T, 32T ($< pT4$) e 5T, 7T, 8T, 12T, 13T, 15T, 20T, 25T, 27T, 30T ($pT4$). O gene *HIST1H4F* não apresentou

diferença de expressão ($p=0,749$). A correlação entre a expressão do gene *HIST1H4F* e seus níveis de metilação no promotor foi negativa e fraca ($r=-0,203$), sem significância estatística ($p=0,503$) (**Figura 30**).

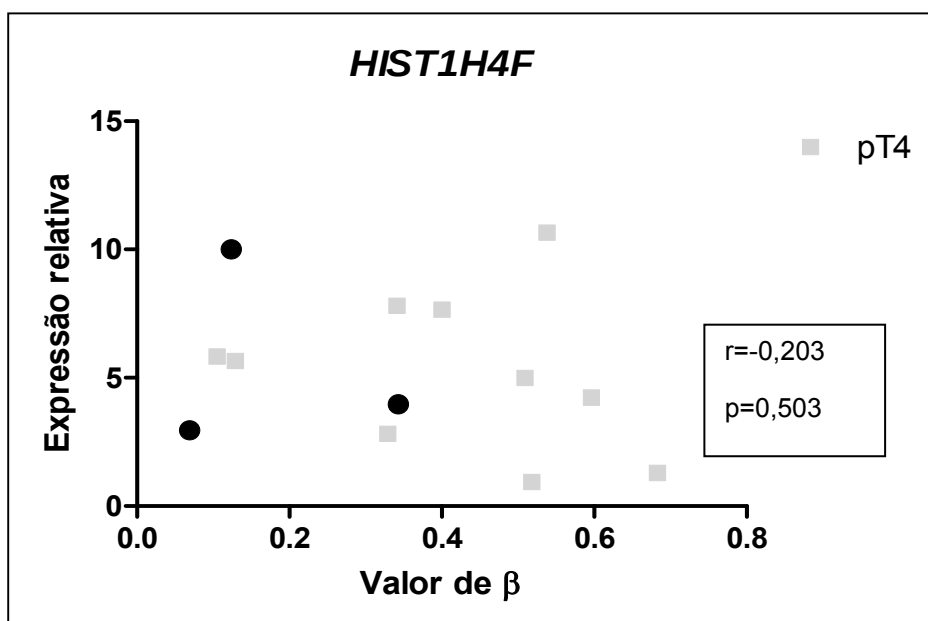


Figura 30 - Gráfico de correlação entre a expressão relativa do gene *HIST1H4F* e os níveis de metilação detectados em sua região promotora. Neste gráfico, cada ponto representa uma amostra analisada. Retângulos cinzas representam o grupo de pacientes com estadiamento pT4, enquanto círculos pretos representam pacientes com estadiamento <pT4.

Para o gene *PAX8-AS1* (*PAX8* antisense RNA 1), hipermetilado em região promotora em pacientes que apresentaram metástase para linfonodos, a diferença de expressão foi calculada entre as amostras 5T, 8T, 12T, 15T, 20T, 24T, 25T, 30T (metástase para linfonodo) e 3T, 4T, 7T, 27T, 29T, 32T, 34T (sem metástase para linfonodo) – as amostras 13T e 16T foram excluídas pois as reações de amplificação do cDNA foram inespecíficas. Detectamos para o gene *PAX8-AS1* diminuição de expressão no grupo de metástase linfonodal,

visto que estava aproximadamente 8,66 vezes mais expresso em pacientes que não desenvolveram metástase linfonodal (hipometilados); este resultado apresentou significância estatística ($p=0,0049$). A correlação entre a expressão do gene *PAX8-AS1* e seus níveis de metilação na região promotora foi negativa e moderada ($r=-0,626$), resultado estatisticamente significativo ($p=0,012$) (Figura 31).

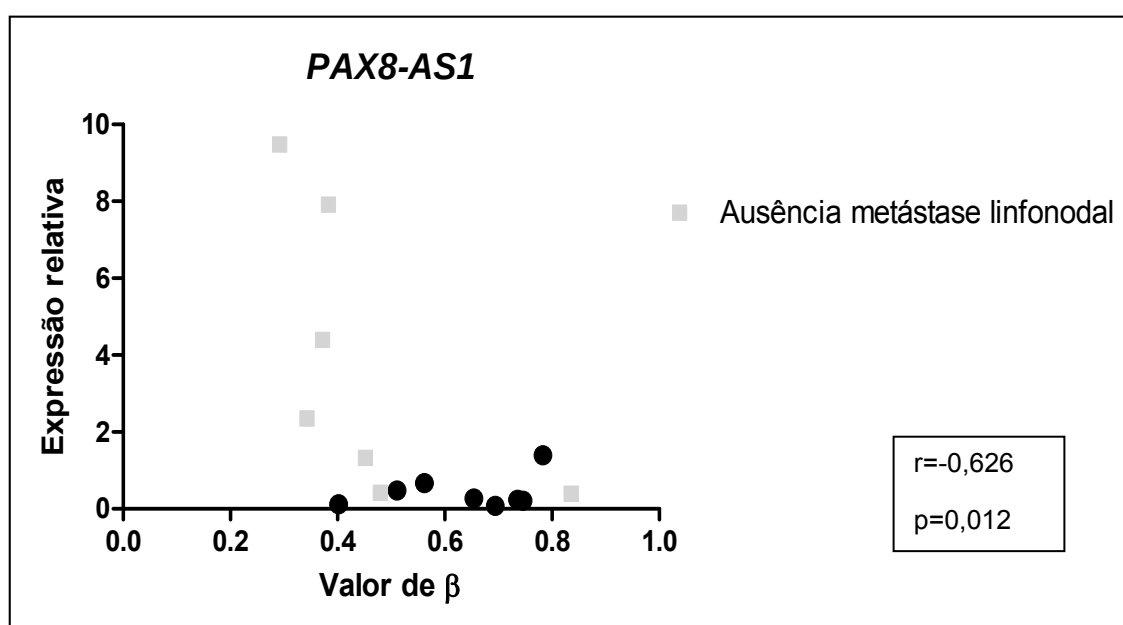


Figura 31: Gráfico de correlação entre a expressão relativa do gene *PAX8-AS1* e os níveis de metilação detectados em sua região promotora. Neste gráfico, cada ponto representa uma amostra analisada. Retângulos cinzas representam o grupo de pacientes com metástase linfonodal, enquanto círculos pretos representam pacientes sem metástase linfonodal.

Para o gene *SSPN*, hipermetilado em região promotora em amostras mutadas na região promotora do gene *TERT*, a diferença de expressão foi calculada entre as amostras 4T, 5T, 12T, 16T, 25T, 30T, 34T (selvagens para a região promotora de *TERT*) e 7T, 8T, 13T, 15T, 20T, 24T, 27T, 29T, 32T, 33T (mutadas na região promotora de *TERT*) – a amostra 3T foi excluída da análise pois a reação de amplificação do cDNA foi inespecífica. O gene *SSPN* estava aproximadamente 1,36 vezes mais expresso em amostras selvagens para a região promotora do *TERT* (hipometiladas), resultado sem significância estatística ($p=0,2422$). A correlação entre a expressão do gene *SSPN* e os níveis de metilação na região promotora foi negativa e moderada ($r=-0,536$), resultado estatisticamente significativo ($p=0,026$) (**Figura 32**).

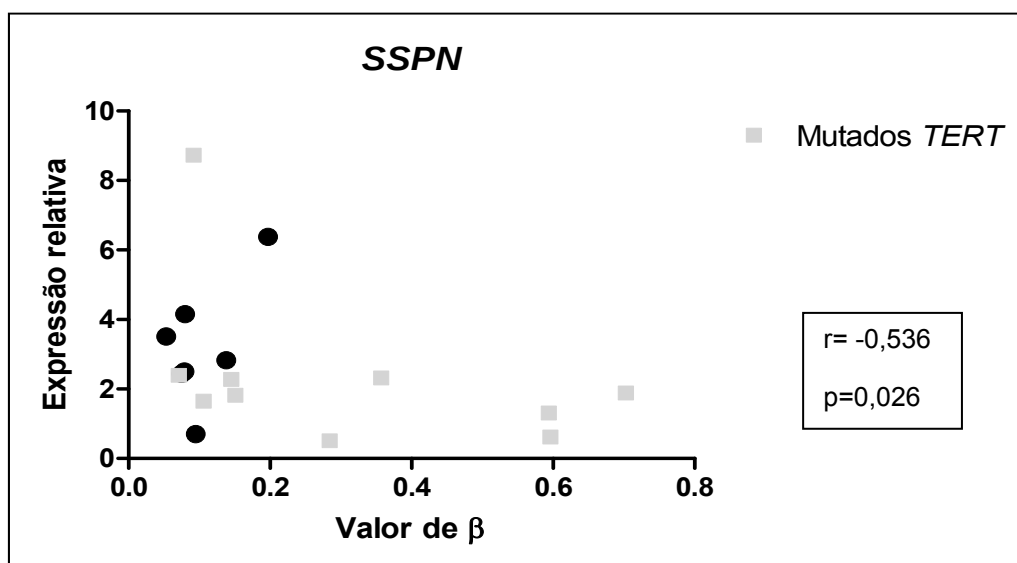


Figura 32 - Gráfico de correlação entre a expressão relativa do gene *SSPN* e os níveis de metilação detectados em sua região promotora. Neste gráfico, cada ponto representa uma amostra analisada. Retângulos cinzas representam o grupo de pacientes com mutações na região promotora do gene *TERT*, enquanto círculos pretos representam pacientes selvagens para mutação na região promotora de *TERT*.

A **Figura 33** sumariza a diferença de expressão relativa dos genes candidatos entre os grupos (*fold-change*).

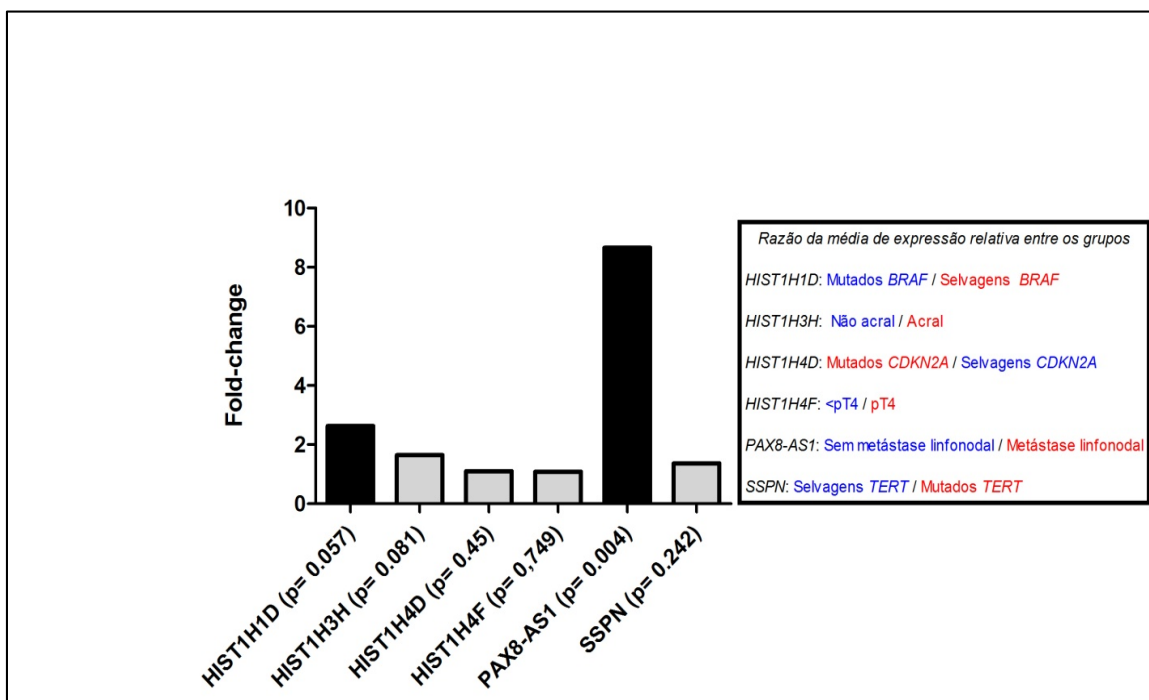


Figura 33 - Diferença de expressão relativa dos genes candidatos selecionados por diferenças de metilação entre grupos com diferentes características clínico-patológicas ou mutacionais. Cada barra indica o *fold-change* da diferença de expressão entre dois grupos para um determinado gene, sendo que a razão está especificada na caixa à direita. Grupos em azul exibiram hipometilação na região promotora do gene avaliado, enquanto que grupos em vermelho apresentaram hipermetilação na região promotora do gene avaliado. Os genes *HIST1H1D* e *HIST1H4F* apresentaram diferença de expressão estatisticamente significativa entre os grupos (barras pretas).

B Análise de metilação diferencial entre melanomas primários portadores de mutações *drivers* e melanócitos saudáveis

Caracterizamos os melanomas primários com mutações *drivers* específicas e os comparamos com o padrão de metilação do grupo controle de melanócitos. Estas análises geraram um número grande de DMRs, como

esperado, tendo em vista que neste momento comparamos células tumorais contra seus respectivos precursores celulares normais. Os melanomas com mutações em *BRAF*, *NRAS*, *CDKN2A*, mutações ativadoras da via MAP-quinase, assim como melanomas com mutações em *TERT*, apresentaram um padrão prevalente de hipermetilação quando comparados aos melanócitos, com grande parte das DMRs apresentando diferença de metilação absoluta entre os grupos maior que 30% (**Tabela 9**).

Tabela 9 - Número de regiões diferencialmente metiladas (DMRs) em promotores gênicos entre melanomas primários agrupados de acordo com presença de mutações *drivers* e melanócitos controle.

		<i>BRAF</i>	<i>NRAS</i>	via MAPK	<i>CDKN2A</i>	<i>TERT</i>
DMRs totais	Hipometiladas	372	260	350	402	478
	Hipermetiladas	855	887	1128	1054	966
	Total	1227	1147	1478	1456	1444
$\Delta\beta > 10\%$	Hipometiladas	340	236	292	360	415
	Hipermetiladas	564	700	777	759	656
	Total	904	936	1069	1119	1071
$\Delta\beta > 30\%$	Hipometiladas	85	89	56	81	83
	Hipermetiladas	236	375	340	397	280
	Total	321	464	396	478	363

Em cada coluna está indicado o número de DMRs encontradas comparando-se tumores primários com a mutação *driver* no gene especificado e melanócitos controle. O total de DMRs em cada análise foi filtrado para identificação dos genes com maior diferença de metilação entre os grupos ($\Delta\beta > 10\%$ e $\Delta\beta > 30\%$).

C Análise de metilação diferencial entre melanomas primários portadores ou não de mutações *drivers* em genes da via MAP-quinase

A maioria das DMRs detectada encontrava-se hipermetilada no grupo de melanomas portadores de mutações na via MAP-quinase, quando comparados às amostras sem mutação (**Tabela 10**).

Tabela 10 - Número de regiões diferencialmente metiladas (DMRs) entre melanomas primários com e sem mutações na via MAP-quinase

		<i>BRAF</i>	<i>NRAS</i>	via MAPK
DMRs totais	Hipometiladas	45	75	47
	Hipermetiladas	60	197	117
	Total	105	272	164
$\Delta\beta > 10\%$	Hipometiladas	24	68	29
	Hipermetiladas	48	182	87
	Total	72	250	116
$\Delta\beta > 30\%$	Hipometiladas	1	9	1
	Hipermetiladas	9	49	13
	Total	10	58	14

Em cada coluna está sumarizado o número de DMRs encontradas comparando tumores primários com a mutação *driver* no gene especificado e tumores selvagens para a via MAP-quinase. As DMRs totais para cada grupo foram filtradas para estimar o número de genes com uma grande diferença de metilação entre os grupos ($\Delta\beta > 30\%$).

Intersecção de DMRs para obtenção de assinatura específica para mutações drivers na via MAP-quinase

Comparamos os grupos de amostras com mutações específicas na via MAP-quinase (*BRAF*, *NRAS* e *KIT*) contra tumores primários não portadores de mutações nesta via. A partir deste resultado, realizamos a intersecção entre o conjunto de genes identificado como diferencialmente metilados de acordo com

a presença de uma mutação *driver* específica na via da MAP-quinase, e o conjunto de genes diferencialmente metilados comparando-se melanomas com mutações na via MAP-quinase com o grupo-controle de melanócitos normais. Buscamos assim delinear uma assinatura de metilação diferencial exclusiva de melanomas portadores de mutações *drivers* específicas da via MAP-quinase. A **Figura 34** ilustra as comparações realizadas utilizando a pipeline customizada.

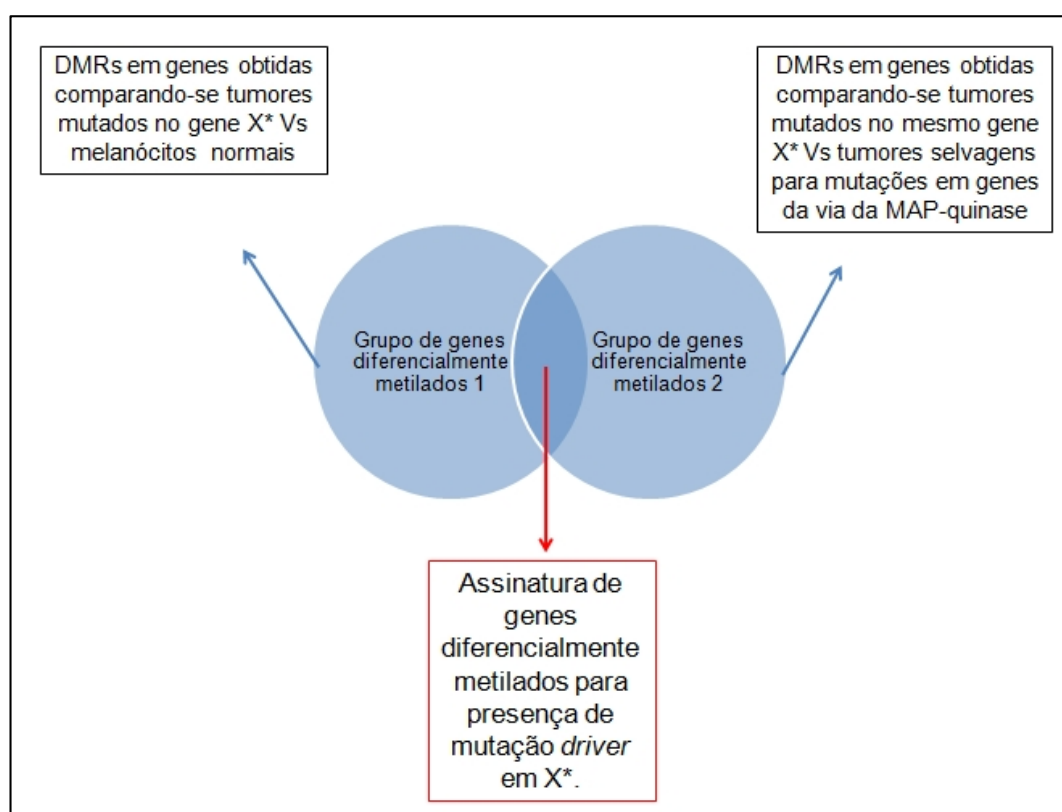


Figura 34 - Intersecção realizada entre os grupos de genes obtidos a partir de diferentes análises de metilação diferencial entre subgrupos portadores de mutações *driver*, com o intuito de obter uma assinatura específica de genes diferencialmente metilados. *Onde X representa mutações nos genes *BRAF*, *NRAS* ou *KIT*.

A assinatura gênica desejada deve ser consistente, de modo que, independentemente do conjunto ao qual o grupo de amostras mutadas na via MAP-quinase esteja sendo comparado e qual gene específico esteja sendo testado, o mesmo grupo de genes com DMRs deve ser encontrado. Partindo deste pressuposto, primeiramente buscamos identificar quais DMRs seriam comuns a melanomas mutados na via MAP-quinase em comparação a amostras selvagens para os genes desta via. Assim, intersectamos o grupo de genes com $\Delta\beta > 10\%$ de cada comparação específica (*BRAF versus* Selvagem em MAPK; *NRAS versus* Selvagem em MAPK; qualquer mutação em MAPK *versus* Selvagem em MAPK; não realizamos esta comparação a partir do gene *KIT* pelo fato do $n(1)$ ser muito pequeno), identificando um total de 30 DMRs presentes nas três comparações - chamadas doravante de *DMRs constitutivas da via MAP quinase (Quadro 5)*. Importante, o sinal de $\Delta\beta$ para cada DMR mantêve-se o mesmo quando os grupos foram comparados, no entanto o valor de $\Delta\beta$ mudou de um grupo para o outro, visto que os grupos comparados são distintos. A **Figura 34** ilustra com o diagrama de Venn as DMRs obtidas nesta etapa.

Quadro 5 - Genes presentes nas DMRs constitutivas da via MAP quinase.

<i>RUNX1T1</i>	<i>B3GALT4</i>	<i>SIM2</i>
<i>MYT1L</i>	<i>IGFBP3</i>	<i>CCDC140</i>
<i>RTL1</i>	<i>C3orf72</i>	<i>VSX1</i>
<i>PCDHA2</i>	<i>PAX6</i>	<i>FLRT2</i>
<i>PCDHA6</i>	<i>HES5</i>	<i>TGFB2</i>
<i>ZIC4</i>	<i>NR2E1</i>	<i>IGFBP5</i>
<i>EVX2</i>	<i>TBX5</i>	<i>TRIL</i>
<i>LCAT</i>	<i>APC2</i>	<i>PRTFDC1</i>
<i>LOC401463</i>	<i>KCNQ1DN</i>	<i>FOXL2</i>
<i>SIGLEC9</i>	<i>MGC12982</i>	<i>C10orf107</i>

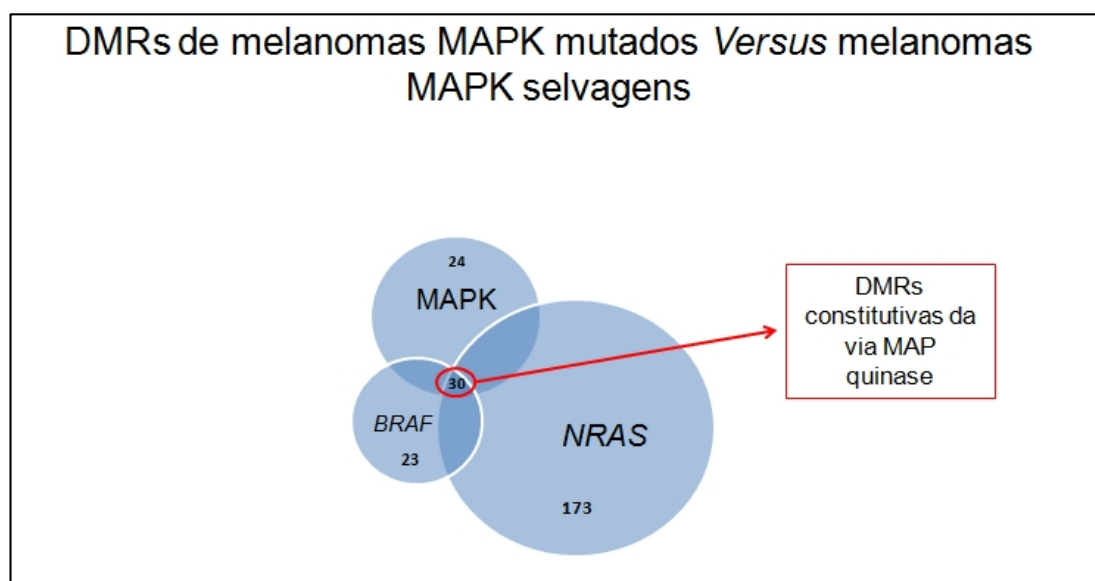


Figura 35 - Obtenção de DMRs exclusivas da via MAP quinase. Cada círculo representa o grupo de DMRs obtido comparando-se amostras mutadas para um dos genes na via da MAP quinase com amostras selvagens nesta via. A intersecção entre os três grupos de DMRs foi aqui interpretado como o conjunto de DMRs constitutivo da via MAP quinase. MAPK: grupo com mutação em *BRAF*, *NRAS* ou *KIT* comparado ao grupo de amostras selvagens nesta via.

Com o intuito de verificar a consistência destas DMRs obtidas, partimos para a obtenção de um segundo conjunto de DMRs que se comportasse como denominador comum da via MAP quinase, mas desta vez realizamos análise de metilação diferencial entre tumores primários portadores de mutações nesta via e melanócitos-controle. Um total de 541 *DMRs candidatas* foram detectadas, independentemente da mutação *driver* na via MAP quinase. Para identificar quais deste grupo de 541 DMRs seriam exclusivas da via MAP quinase, ou seja, encontradas unicamente na presença de mutações nesta via, intersectamos este grupo com as DMRs obtidas nas comparações entre amostras mutadas para *TERT* ou para *CDKN2A* e melanócitos controle. Como resultado, 516/541 DMRs também foram identificadas nas outras duas listas de DMRs, indicando não serem DMRs exclusivas da via MAP quinase, mas sim *DMRs constitutivas de melanomas cutâneos*, independentemente do *background* mutacional. A **Figura 35** ilustra o resultado das comparações realizadas nesta análise. O anexo 2 lista os 516 genes associados às DMRs identificadas como assinatura epigenética do melanoma cutâneo.

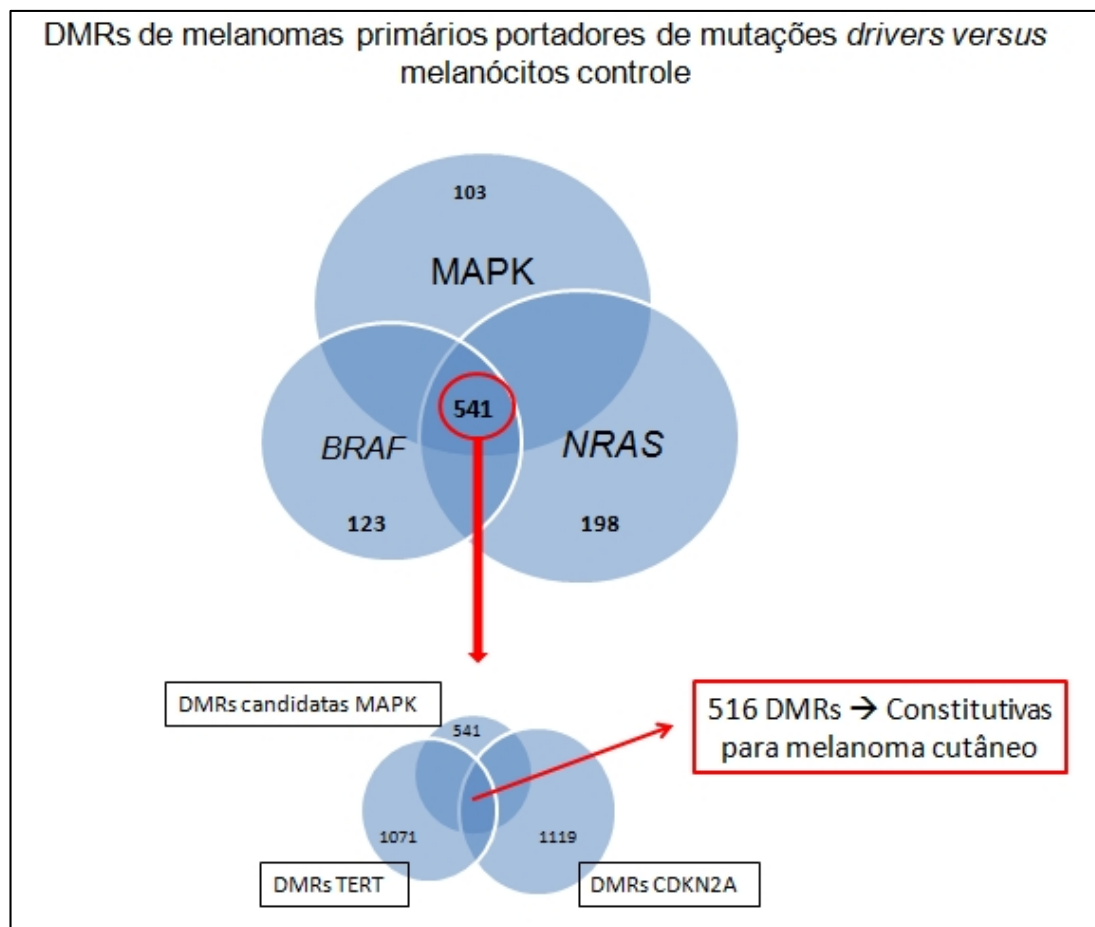


Figura 36 - Obtenção de DMRs constitutivas de melanomas cutâneos. Acima, cada círculo maior representa o grupo de DMRs obtidas comparando-se amostras mutadas para um dos genes na via da MAP quinase e melanócitos-controle. As 541 DMRs comuns aos elementos da via MAPK foram comparadas às DMRs obtidas na comparação de amostras mutadas para *TERT* e *CDKN2A* contra melanócitos. MAPK: grupo com mutação em BRAF, NRAS ou KIT comparado contra amostras selvagens nesta via.

Estes resultados indicaram que uma assinatura de DMRs exclusiva para a via MAP-quinase era improvável. Para descartarmos esta hipótese em definitivo, realizamos a intersecção das 30 DMRs constitutivas para a via MAP quinase com as 541 DMRs candidatas, obtendo um total de 22 DMRs consistentemente presentes em melanomas portadores de mutações na via MAP quinase. No entanto, 21/22 DMRs fazem parte também do grupo de 516

DMRs constitutivas de melanoma. Desta forma, descartamos a hipótese de uma possível assinatura de metilação diferencial exclusiva para melanomas portadores de mutações na via da MAP quinase, identificando de fato uma assinatura de metilação diferencial em melanomas cutâneos, presente independentemente do *background* mutacional. A **Figura 36** ilustra as comparações feitas nesta etapa.

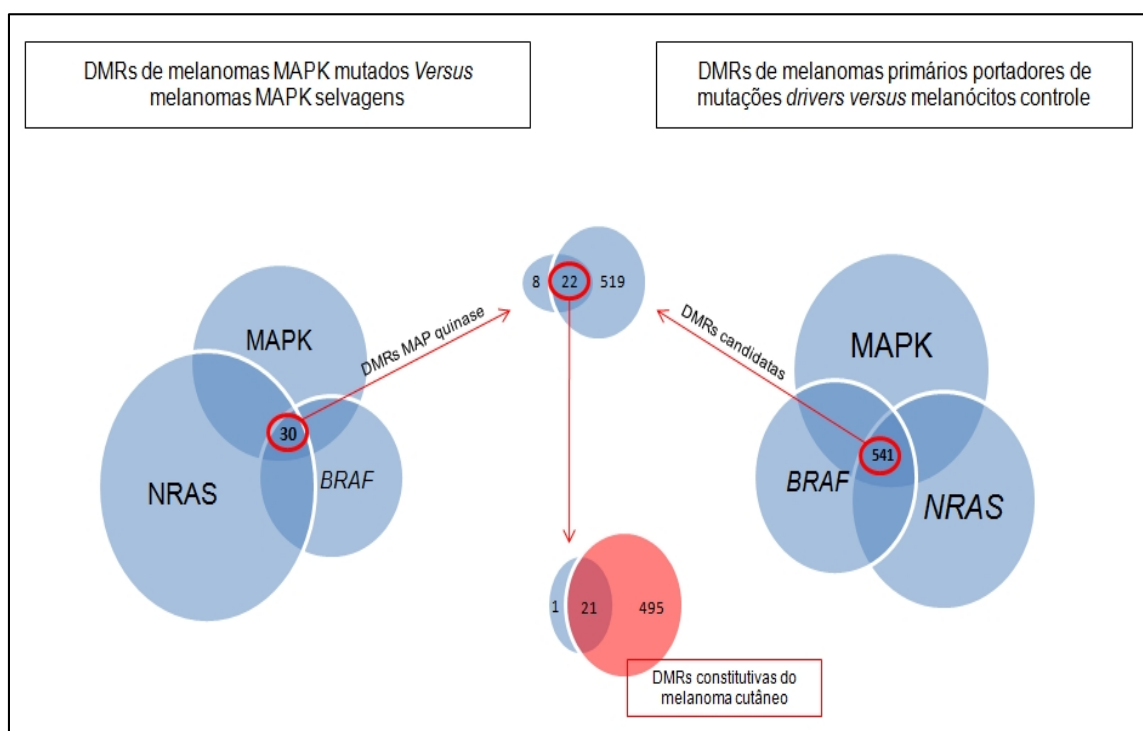


Figura 37 - Testando a hipótese de assinatura de DMRs exclusiva de melanomas com mutação na via MAP-quinase. Ao compararmos o conjunto de 22 DMRs obtidas através da intersecção de DMRs constitutivas da via MPA-quinase e DMRs candidatas com as 516 DMRs constitutivas dos melanomas cutâneos (círculo vermelho), observamos que praticamente todos os genes pertencem ao último grupo. O único gene que foi exclusivo da via MAP quinase foi *TGFB2*.

Realizamos análise dos processos biológicos relacionados aos genes associados às 516 DMRs constitutivas de melanomas cutâneos, que revelou um enriquecimento para funções de ligação ao DNA em sequências específicas, ligação de fatores de transcrição ao DNA, bem como regulação do desenvolvimento celular. A **Quadro 6** descreve os processos biológicos significativamente associados com as DMRs constitutivas para o melanoma cutâneo.

Quadro 6 - Enriquecimento de processos biológicos do grupo de genes associados às DMRs constitutivas para melanomas cutâneos.

Processos biológicos enriquecidos	Razão de enriquecimento	p ajustado
Regulação negativa do desenvolvimento celular	23,25	0,0136
Ligação à sequências específicas do DNA	8,43	0,0004
Ligação da RNA pol II em regiões regulatórias do DNA	25,47	0,0098

5 DISCUSSÃO

5.1 INVESTIGAÇÃO DE ALTERAÇÕES CAUSAIS RELEVANTES NO MELANOMA CUTÂNEO

Após extensa revisão de literatura, um painel de alterações causais relevantes no melanoma cutâneo foi construído para verificar a distribuição destas em nossa coorte, visando posteriormente a investigação de possíveis perfis distintos de metilação do DNA decorrentes destas alterações.

Mutações no gene *BRAF* estão entre as mais presentes no melanoma cutâneo, especialmente a alteração c.1799T>A, localizada no códon 600 do gene (V600E). A alta frequência desta alteração específica em melanoma cutâneo e outros tipos de cânceres configura um *hot spot*, como é possível observar através de uma busca pela alteração na base de dados COSMIC (<http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>) (**Figura 37**). Em nosso grupo de tumores, a alteração V600E foi a mais recorrente no gene *BRAF*(ver Figura 11), presente em 35% dos melanomas primários (ver Figura 14), em uma proporção semelhante a outros trabalhos recentes, que relatam frequências entre 36% - 63% (HODIS et al. 2012; HEIDENREICH et al. 2014; YAMAZAKI et al. 2015).

Mutações no gene *NRAS* também são frequentes no melanoma cutâneo, ocorrendo em geral no éxon 2, apesar de alterações no éxon 1

também serem descritas (ELLERHORST et al. 2011). Em nosso estudo, 20% dos tumores primários exibiram mutações no éxon 2, códon 61 (c.182A>N), uma frequência semelhante à descrita em trabalhos recentes, que varia entre 7% - 26% dos casos (ELLERHORST et al. 2011; HODIS et al. 2012; HEIDENREICH et al. 2014). As mutações relatadas nestes estudos também se concentram no éxon 2 do gene *NRAS*.

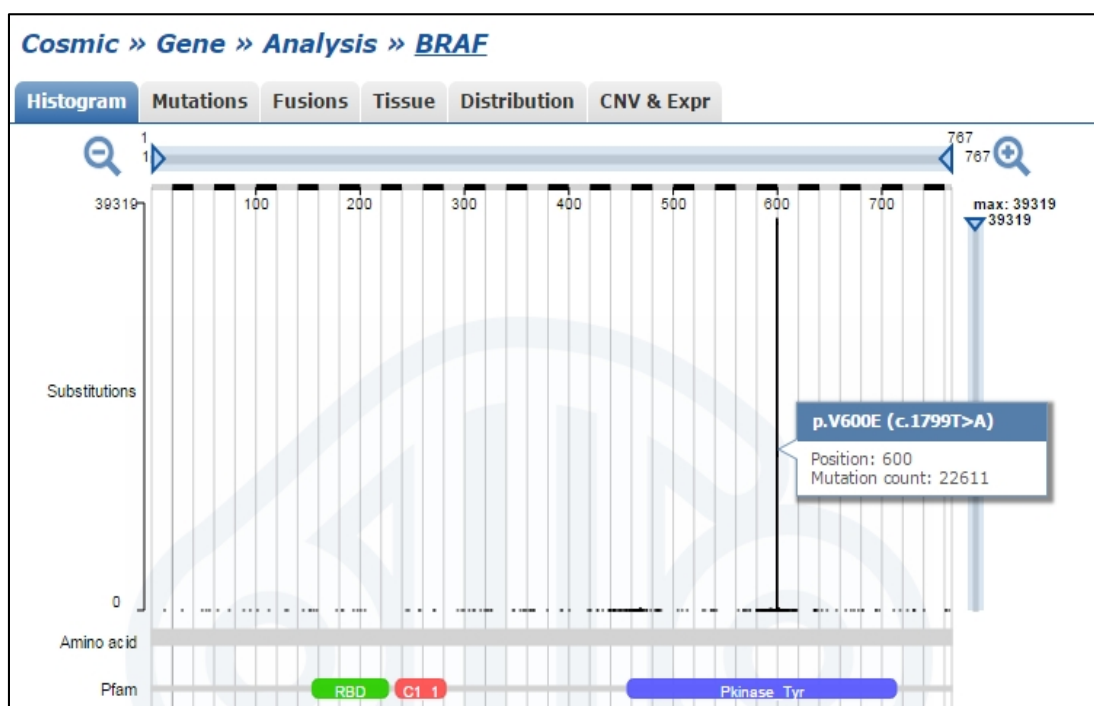


Figura 38 - A alteração c.1799T>A é um *hot spot* no gene *BRAF* em melanoma cutâneo e outros tipos de câncer. Neste histograma todas as mutações descritas no gene *BRAF* estão distribuídas de acordo com sua localização na sequência gênica. A alteração V600E possui uma frequência muito maior (22611 contagens) que outras alterações descritas no gene. A parte inferior da figura aponta os domínios da proteína codificada; a alteração V600E ocorre, portanto, no domínio tirosina-quinase da proteína. Data do acesso: 11/02/2015.

Alterações no gene *KIT* também são eventos causais no melanoma cutâneo; no entanto, são menos frequentes e estão normalmente (mas não exclusivamente) associadas com o subtipo histológico acral (HODIS et al. 2012). Em nossa coorte, apenas um tumor foi detectado com mutação no éxon 11, em paciente com melanoma acral, totalizando 5% da casuística. Este percentual é semelhante ao descrito na literatura (2%-5%) (HANDOLIAS et al. 2010; HODIS et al. 2012).

A via MAP quinase é um importante transdutor de sinais relacionados à proliferação celular, antagonizando vias apoptóticas. No melanoma cutâneo, aproximadamente 90% dos casos possuem uma hiper-ativação desta via, sendo que os genes frequentemente mutados são *BRAF* e *NRAS* e, em menor proporção, *KIT* (SMALLEY 2010). As mutações nos genes da via MAP quinase apresentam padrão mutuamente exclusivo, apesar de estudos recentes relatarem raros casos de tumores portadores de mutações em *BRAF* e *NRAS* simultaneamente (HODIS et al. 2012). Em nosso trabalho, entretanto, as mutações na via MAP quinase detectadas foram mutuamente exclusivas, totalizando 60% dos casos (ver Figura 17).

Recentemente, mutações na região promotora do gene *TERT* foram descritas em casos de melanoma familiar e melanoma esporádico com frequências variando de 33% a 71% (HORN et al. 2013; HUANG et al. 2013; HEIDENREICH et al. 2014). Um destes trabalhos decreveu associação entre as mutações no promotor do *TERT* e tumores mais espessos e presença de ulceração. No presente estudo, detectamos mutações no promotor do *TERT* em 60% dos tumores. Ainda, é importante ressaltar que todos os tumores com

mutação em *BRAF* e três dos quatro tumores com mutações em *NRAS* também apresentaram mutação na região promotora de *TERT*. Recentemente, um trabalho apontou uma associação estatisticamente significativa entre mutações concomitantes no promotor do *TERT* e mutações em *NRAS* ou *BRAF* (HEIDENREICH et al. 2014).

O gene *CDKN2A* codifica duas proteínas supressoras tumorais: p16^{INK4a} e p14^{ARF}. A perda da função de uma destas proteínas é, portanto, um evento importante na melanomagenese, especialmente pelo fato de aproximadamente 40% dos casos de melanoma familiar serem causados por mutações germinativas em *CDKN2A*, na grande maioria dos casos afetando a isoforma p16 (DE ARAÚJO et al. 2014). Melanomas esporádicos apresentam microdeleções e mutações neste gene em 30% a 50% dos casos (DUTTON-REGESTER e HAYWARD 2012; HODIS et al. 2012). Adicionalmente, o gene *CDKN2A* pode ser regulado por hipermetilação do DNA na sua região promotora e a ausência de seus produtos proteicos por quaisquer mecanismos resulta em desregulação do ciclo celular. Uma frequência de 25% de hipermetilação do promotor de *CDKN2A* foi descrita em amostras de melanoma esporádico (KOSTAKI et al. 2014). Em nosso estudo, 50% das amostras apresentaram microdeleções e 15% dos tumores exibiram hipermetilação do promotor de *CDKN2A*, resultado que se aproxima das estimativas de frequência de inativação de *CDKN2A* presentes na literatura. Vale ressaltar que dois dos três casos com hipermetilação no promotor de *CDKN2A* eram tumores com estadiamento pT4 (para o terceiro caso esta informação não estava disponível no laudo anatomopatológico), de maneira semelhante a

estudo recente que relatou significância estatística na associação entre hipermetilação de *CDKN2A* e tumores mais espessos (KOSTAKI et al. 2014).

Entre os sete pares de tumores primários e suas respectivas metástases, cinco apresentaram um quadro de alterações causais idêntico (ver Figura 18). Dois pares, entretanto, apresentaram diferenças: uma das metástases (12M) adquiriu hipermetilação da região promotora do gene *CDKN2A*; outra metastátase (30M) apresentou mutações em *BRAF* e na região promotora do gene *TERT*, além de adquirir hipermetilação de promotor no alelo remanescente do gene *CDKN2A*, enquanto o tumor primário (30T) apresentava apenas deleção de um dos alelos de *CDKN2A*.

O aumento da frequência de eventos de hipermetilação no promotor de *CDKN2A* em metástases encontra respaldo em um trabalho recente que observou a perda da expressão da proteína p16^{INK4a} em tecidos de melanomas metastáticos, juntamente com uma frequência de 25% de hipermetilação na região promotora do gene *CDKN2A* (JONSSON et al. 2010).

Já o aparecimento posterior das mutações causais em *BRAF* e *TERT* em tecido metastático evidencia talvez alta heterogeneidade já no tumor primário, uma característica de alguns tipos de câncer (ROBERTSON-TESSI et al. 2015). Um trabalho recente analisou um caso em que o melanoma primário apresentava alterações causais em *BRAF* e *CDKN2A*, enquanto o tecido metastático apresentava adicionalmente mutações na região promotora do gene *TERT* (HOSLER et al. 2015). No entanto, o caso analisado em nosso trabalho apresenta uma divergência ainda maior entre o tumor primário e tecido metastático, um processo que pode ter implicações clínicas importantes, como

respostas diferenciadas a determinados tratamentos (VARADA e MAHALINGAM 2015). Ainda, é importante ressaltar que a técnica de sequenciamento capilar apresenta um limite de detecção de alelos com frequência entre 15%-20%, e o tumor primário 30T poderia apresentar mosaicismo em baixo grau com células mutadas em *BRAF* e *TERT*, que não tiveram seus alelos mutados detectados em nossos ensaios.

5.2 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE METILAÇÃO DO ELEMENTO REPETITIVO *LINE-1*

Os níveis de metilação do elemento repetitivo *LINE-1* no melanoma cutâneo são pouco explorados na literatura. Portanto, além de obtermos a frequência absoluta de metilação, buscamos também correlacionar os níveis de metilação com características clínicas e patológicas dos pacientes.

Dos vinte tumores primários de nossa casuística, cinco (20%) apresentaram uma mediana dos níveis de metilação em *LINE-1* inferiores a 50%, uma característica que pode levar a maior instabilidade genômica nestas populações de células tumorais. Ao observarmos que características seriam comuns a estes tumores com hipometilação de *LINE-1*, 4/5 apresentaram estadiamento patológico pT4 (um dos tumores não possuía esta informação no laudo anatomopatológico) e todos eram portadores de algum evento de inativação do gene *CDKN2A*, fosse deleção ou hipermetilação na região promotora. Uma destas amostras hipometiladas (30T, que apresentou mediana de metilação de 30%), possuía também mutações em *NRAS*, na região

promotora do gene *TERT*, além de ser um dos tumores a apresentar deleção em homozigose do gene *CDKN2A*; este tumor também foi classificado como pT4, demonstrando uma possível relação entre hipometilação do elemento *LINE-1* e presença de alterações em *CDKN2A*, além de prognóstico desfavorável.

A possível associação entre hipometilação em *LINE-1* e início ou progressão da doença é respaldada por estudo que observou hipometilação em *LINE-1* em tumores primários quando comparados à pele normal e também a nevos (HOSHIMOTO et al. 2012). Em nosso estudo, tumores primários também apresentaram valores de metilação em *LINE-1* menores que os melanócitos normais, apesar de não haver significância estatística. Este mesmo trabalho de HOSHIMOTO et al. (2012) ainda relata uma associação significativa entre aumento da desmetilação em *LINE-1* e estadiamento clínico avançado. De maneira semelhante aos nossos dados, o referido trabalho não encontrou significância estatística entre hipometilação em *LINE-1* e características anatomopatológicas independentes, como ulceração.

5.3 PERFIL GLOBAL DE METILAÇÃO DO DNA NO MELANOMA CUTÂNEO

As análises de metilação diferencial realizadas entre subgrupos distintos de amostras utilizaram duas abordagens principais, uma delas desenvolvendo a pipeline de análise ChAMP (MORRIS et al. 2014) e a segunda feita com a elaboração de um protocolo *in house*, em colaboração com o professor Dr.

Andre Yoshiaki Kashiwabara.

A utilização de uma plataforma de microarranjo para análise de metilação do DNA, juntamente com o fato da plataforma HM450K possuir dois sistemas de detecção de sinal impõem limitações e desafios para a análise dos resultados. Por conta disso, várias *pipelines* foram desenvolvidas e comparadas, com o intuito de identificar métodos de normalização de dados mais eficientes (MARABITA et al. 2013; WU et al. 2014). O trabalho de Marabita et al. comparou as diversas *pipelines* recentemente desenvolvidas para análise de dados de metilação, considerando a diminuição da variabilidade entre replicatas técnicas e a correção do viés entre os dois sistemas de detecção da plataforma HM450K como objetivos em comum para todas as *pipelines*. Estes autores concluíram que uma etapa de controle de qualidade, seguida da normalização dos dados pelo método BMIQ, seria o método mais eficiente. Desta forma, tanto na *pipeline* ChAMP quanto na *pipeline* desenvolvida *in house*, optamos por esta estratégia de normalização de dados.

A utilização da pipeline ChAMP leva em consideração o conceito de regiões diferencialmente metiladas (DMRs - ver figura 8), no qual um mínimo de três sondas adjacentes são necessárias para construção de uma DMR. Se por um lado esta abordagem reforça uma possível relevância biológica dos sítios identificados, existe o problema de negligenciarmos sítios CpGs individuais que sejam diferencialmente metilados e possuam importância biológica, visto que, em algumas situações, até um único dinucleotídeo CpG poderia exercer papel regulatório em um gene (MURAYAMA et al. 2006).

Outro problema inerente à utilização da pipeline ChAMP e de todas as outras publicadas seria a análise da maioria das sondas presentes na plataforma HM450K na comparação entre grupos relativamente pequenos, como no presente estudo. O grande número de testes estatísticos realizados para correção implica em penalizações estatísticas, que podem ter mascarado diferenças biologicamente relevantes.

Assim, também desenvolvemos uma segunda estratégia de análise do padrão global de metilação do DNA em melanomas cutâneos, realizando a comparação entre melanomas primários agrupados de acordo com o espectro mutacional e características clinico-patológicas. Nesta segunda análise, foram testadas apenas sondas mapeadas em promotores gênicos, consolidando um único valor de β para cada gene. Desta maneira, diminuímos consideravelmente a quantidade de correções de p valor, visando a identificação de diferenças com robustez estatística. No entanto, ao utilizarmos apenas as sondas presentes em regiões promotoras, informações pertinentes acerca de outras regiões genômicas, especialmente o corpo dos genes, foram descartadas.

Análise de metilação diferencial utilizando a pipeline ChAMP

(a) Comparação entre tumores primários e melanócitos normais

A primeira análise de metilação diferencial foi realizada com todas as sondas da plataforma HM450K. A comparação entre melanomas primários e melanócitos normais utilizados como células de referência (controles)

identificou um grande número de sítios hipermetilados nos tumores, distribuídos majoritariamente no corpo gênico e em regiões intergênicas, e em menor número em promotores gênicos (ver Figura 20). De maneira geral, células tumorais de diversos tipos adquirem metilação em promotores gênicos que contêm ilhas CpG, juntamente com perda global de metilação de DNA, localizada mais em regiões intergênicas e também no corpo de genes (ESTELLER 2007; TABY e ISSA 2010; SHEN et al. 2013). Até o presente momento, não há trabalhos em melanoma cutâneo descrevendo o padrão global de metilação de DNA em regiões outras que não promotores gênicos particulares. Embora a plataforma HM450K apresente distribuição maior de sondas em promotores gênicos e em ilhas CpG do que em regiões intergênicas, nossos resultados nos melanomas indicam um padrão de metilação diferente do descrito na literatura em regiões intergênicas e no corpo de genes.

É importante ressaltar que a comparação entre melanomas primários e tecidos normais adjacentes não é possível, visto que a distribuição espaçada e baixa proporção de melanócitos na pele dificulta seu isolamento do restante das células sem utilização de técnicas de cultura de células (CICHOREK et al. 2013). A utilização, portanto, de culturas primárias de melanócitos foi a opção mais viável para análise de metilação do DNA comparativa, buscando um mecanismo tecido-específico. No entanto, é sabido que culturas de células sofrem alterações no perfil epigenético que se acentuam de acordo com o tempo em cultura: alterações no padrão de metilação do DNA estão relacionadas à hipermetilação em promotores gênicos específicos, mas o

evento mais marcante, no entanto, é a perda global de 5-hidroximetilcitosina (5hmC) (NESTOR et al. 2015). Desta forma, não podemos excluir um possível viés em parte de nossos resultados, proveniente da utilização de culturas de melanócitos como padrão de referência para melanomas.

A presença em melanomas cutâneos de um grande número de eventos de hipermetilação no corpo gênico representa um desafio adicional ao entendimento da melanomagenese: Um trabalho recente desenvolveu um método para avaliar se os níveis de metilação em segmentos distintos de um gene poderiam prever o nível de expressão (LOU et al. 2014). Os autores relatam que tanto eventos de metilação em promotores gênicos com alta densidade de dinucleotídeos CpG quanto a metilação no corpo dos genes são parâmetros capazes de prever os níveis de expressão gênica; ainda, aparentemente a metilação no corpo do gene apresenta correlação negativa com a expressão gênica ainda mais evidente do que a correlação entre metilação no promotor do gene e sua expressão. Desta forma, a hipermetilação predominante em sítios localizados no corpo gênico que detectamos nos tumores poderia estar associada com alteração da expressão de vários genes.

Recentemente, eventos de hipometilação de DNA em regiões intergênicas foram associados à reativação de elementos de transposição, que adquiriam atividade de *enhancer* na regulação positiva da expressão de genes adjacentes (XIE et al. 2013). Neste trabalho, famílias específicas de elementos de transposição exibiam hipometilação de uma maneira tecido-específica, de maneira que os genes mapeados em uma distância de até 500kb de tais elementos eram relacionados com funções relevantes para o tecido

correspondente. Considerando esta observação e o número elevado de DMRs (*differentially methylated regions*) que detectamos em sequências não-codificadoras neste estudo, investigamos uma possível associação destas DMRs hipometiladas com elementos de transposição. Metade das DMRs hipometiladas nos melanomas cutâneos estava associada a elementos de transposição, além de apresentarem genes mapeados numa janela de 500Kb à montante e à jusante. A maioria destes genes apresenta algumas alterações já relatadas em melanomas cutâneos, apesar de não estarem relacionados com nenhuma via clássica deste tipo tumoral. A presença de outros elementos genéticos e epigenéticos nestas DMRs, como por exemplo lncRNAs e marcas de ativação em histonas, dá indícios de que eventos de metilação aberrante em sequências intergênicas ligadas a elementos repetitivos poderiam ter um impacto funcional na tumorigênese ou progressão do melanoma.

(b) comparação entre melanomas primários de acordo com características clinico-patológicas e mutacionais

As análises de metilação diferencial realizadas entre subgrupos distintos de tumores agrupados de acordo com características clinico-patológicas e de acordo com o perfil de mutações causais que foi realizada utilizando a pipeline ChAMP resultou, na maioria dos casos, em ausência de detecção de diferenças de metilação. Como anteriormente mencionado, a utilização de microarranjos genômicos de alta resolução como HM450K pressupõe a realização de um número grande de correções de p valor para identificação de alterações potencialmente reais. No entanto, disso decorre uma penalidade

estatística proporcional ao número de alvos testados, o que é intrinsecamente desvantajoso em situações específicas, particularmente na presença de diferenças sutis entre grupos, tamanho amostral pequeno e grupos constituídos por amostras heterogêneas. Portanto, a análise de metilação diferencial utilizando a pipeline *ChAMP* revelou-se inadequada para a presente casuística, provavelmente devido ao tamanho reduzido dos diferentes subgrupos comparados.

Análise de metilação diferencial utilizando a pipeline customizada

Recentemente, 1402 sítios CpGs foram avaliados em melanomas cutâneos (THOMAS et al. 2014) e foi identificada uma prevalência de eventos de hipermetilação em tumores portadores da mutação $BRAF^{V600E}$, enquanto que outro estudo (GAO et al. 2013) não encontrou um perfil de metilação exclusivo nestes tumores em associação à presença de mutações em *BRAF* e *NRAS*. Outro trabalho recente (MARZESE et al. 2014), investigando amostras de metástase cerebral de melanomas cutâneos, também não identificou relação entre mutações em *BRAF* e *NRAS* e perfis distintos de metilação. Desta forma, fica evidente que a associação entre assinaturas específicas de metilação de DNA e mutações causais ainda não se encontra bem estabelecida no melanoma cutâneo, mostrando o quanto nosso estudo pode ainda contribuir para ampliar esse conhecimento.

Nossa análise revelou nos tumores portadores de mutações causais (mutações nos genes *BRAF*, *NRAS*, *KIT* e região promotora do *TERT*, e

inativação de *CDKN2A* por deleção ou hipermetilação de promotor) padrões de metilação de DNA globais distintos, a depender da mutação causal avaliada. Amostras mutadas em *BRAF* ou *TERT* exibiram número maior de eventos de hipometilação, resultado discrepante em relação ao já relatado no estudo citado acima. Mutações em *NRAS* ou mutações na via MAP-quinase (*NRAS*, *BRAF*, *KIT*) estiveram em nosso estudo associadas preferencialmente a eventos de hipermetilação. As discrepâncias de resultados entre os estudos podem ser causadas por inúmeros fatores: diversidade de subtipos histológicos analisados conjuntamente (com exceção do trabalho que analisou apenas metástases cerebrais de melanoma) podem introduzir viéses na análise; a utilização de métodos alternativos de normalização de dados e pesquisa de metilação diferencial nos estudos também pode contribuir para diferenças entre os resultados; assim como um número amostral reduzido, utilizado neste estudo e nos trabalhos publicados, que poderia diluir resultados relevantes em função da grande heterogeneidade intertumoral sempre existente em tumores sólidos.

Tumores portadores de inativação de *CDKN2A* exibiram quantidade equivalente de eventos de hipo e hipermetilação de promotores gênicos, indicando um padrão generalista de desregulação epigenética em relação aos demais. Até o presente momento, não existem trabalhos na literatura descrevendo associação entre a presença de mutações em *TERT* ou *CDKN2A* em melanomas cutâneos e perfil distinto de metilação.

A análise visando a associação entre diferentes características clínico-patológicas e padrão de metilação evidenciou alterações distintas em

associação às mesmas. Melanomas acrais em comparação aos demais subtipos, assim como melanomas com presença de infiltrado inflamatório, apresentaram um grande número de promotores gênicos hipermetilados. Notavelmente, foi detectado em melanomas acrais um enriquecimento de vias biológicas relacionadas com resposta imune humoral e imunidade mediada por células B; este resultado é instigante pelo fato deste subtipo de melanoma cutâneo geralmente estar associado à presença de infiltrado inflamatório e reação inflamatória local (PILIANG 2011).

Adicionalmente, tumores de pacientes que desenvolveram metástase linfododol apresentaram um padrão de hipometilação na quase totalidade dos promotores gênicos. Eventos de hipometilação em promotores gênicos específicos estão relacionados com pior prognóstico em câncer de ovário e endométrio, por exemplo (HOIVIK et al. 2014; LIAO et al. 2014). Em melanoma cutâneo, no entanto, não há estudos associando hipometilação em promotores gênicos com pior prognóstico. Tumores com estadiamento pT4 ou com ulceração apresentaram um número equivalente de eventos de hipo e hipermetilação em promotores gênicos, sendo que os genes afetados integram processos biológicos relacionados ao crescimento celular e migração celular, respectivamente.

Analizamos nossos dados à luz de trabalhos recentes (ECSEDI et al. 2014; THOMAS et al. 2014), como o estudo de Thomas et al., no qual melanomas cutâneos com estadiamento pT4 apresentaram maior número de promotores hipermetilados, ao passo que amostras com presença de ulceração apresentaram uma frequência semelhante de eventos de hipo e hipermetilação

do DNA, de maneira semelhante aos nossos resultados. O trabalho de ECSEDI et al. (2014) com amostras de melanoma cutâneo relata hipometilação para a maioria dos sítios CpG em promotores gênicos em amostras com pior prognóstico, em destaque para tumores estadiados como pT4 e com presença de ulceração, resultado parcialmente diferente de nosso estudo.

Dos genes que identificamos como diferencialmente metilados em melanomas com índice de Breslow acima de 4mm, apenas o gene *HOXA9* (homeobox A9) havia sido anteriormente identificado como alvo de alteração epigenética, tanto em melanomas cutâneos (THOMAS et al. 2014), como em câncer de ovário; eventos de hipermetilação na região promotora de *HOXA9* estão também relacionados com maior risco de metástase em cânceres orais (KO e NAORA 2014; UCHIDA et al. 2014).

A comparação entre os genes diferencialmente metilados identificados em nosso estudo e os genes descritos no trabalho de ECSEDI et al. (2014) revelou 4 genes em comum, de acordo com características patológicas ou mutacionais: *LTA* (lymphotoxin alpha) (índice de Breslow > 4mm); *LTA*, *DCC* (DCC netrin 1 receptor) e *EPHA5* (EPH receptor A5) (presença de ulceração); *COL1A2* (collagen, type I, alpha 2) (mutação em *BRAF*). Importante, o gene *DCC* é um importante supressor tumoral frequentemente inativado em carcinoma colorretal (CHO e FEARON 1995), enquanto que polimorfismos no gene *LTA* estão associados com linfomas de células T (LIU et al. 2013). Já o gene *EPHA5* é frequentemente inativado por hipermetilação em sua região promotora em câncer de mama e de próstata (FU et al. 2010; LI et al. 2015). O gene *COL1A2* também já foi descrito como hipermetilado em melanoma e em

outros tipos de câncer, estando associado com prognóstico desfavorável (ANDERTON et al. 2008; MORI et al. 2009; BONAZZI et al. 2011; MISAWA et al. 2011-2012).

Portanto, aparentemente tanto perda quanto ganho de metilação podem estar relacionados a características clínicas associadas a pior prognóstico, sendo que o resultado pode depender da característica avaliada e da função celular potencialmente afetada pela modificação epigenética: tumores com estadiamento > pT4 ou ulcerados ganham e perdem metilação em promotores gênicos em mesma proporção; enquanto que pacientes que desenvolvem metástase linfonodal apresentam em seus tumores primários grande perda de metilação em regiões promotoras.

5.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES CANDIDATOS

Selecionamos 6 genes com grandes diferenças de metilação entre grupos formados de acordo com características clinico-patológicas e mutacionais para avaliar seus níveis de expressão: *HIST1H1D*, *SSPN*, *HIST1H4D*, *HIST1H3H*, *PAX8-AS1* e *HIST1H4F*, listados na Tabela 8.

A correlação entre hipermetilação de ilha CpG em região promotora de um gene e expressão é sabidamente negativa para a maioria das situações (JONES 2012; LOU et al. 2014), ou seja, quanto maior o nível de metilação na região promotora, menor será o nível de expressão gênica. Desta forma, a hipermetilação em promotores associados a ilhas CpG é um evento diretamente relacionado à repressão transcricional. Observamos que todos os

genes analisados se comportaram em conformidade com esta premissa em nossas análises. De acordo com LOU et al. (2014), de maneira geral, ao plotarmos os valores de metilação do DNA dos genes contra seus respectivos valores de expressão relativa, podemos esperar uma distribuição de pontos em forma de L: pontos em regiões de valores máximos estarão próximos às abscissas e ordenadas, representando situações em que a correlação entre metilação do DNA e expressão gênica é fortemente negativa; outra parte dos pontos irá se concentrar na proximidade ao ponto de encontro das abscissas e ordenadas, uma região onde a correlação entre metilação do DNA e expressão não é evidente. Como podemos observar em nossos dados (ver figuras 26-31), o comportamento da correlação entre metilação de DNA e expressão gênica previsto pelo trabalho de Shaoke et al. foi detectado nos seis genes que investigamos, embora apenas três com p valor <0.05.

Dos seis genes que tiveram os níveis de expressão mensurados, quatro (*HIST1H3H*, *HIST1H4D*, *HIST1H4F* e *SSPN*) não apresentaram diferença de expressão entre os grupos comparados (*fold*) com significância estatística. Apesar dos genes *HIST1H3H*, *HIST1H4F* e *SSPN* terem apresentado níveis de expressão diminuídos nos tumores com hipermetilação em promotor, outros elementos regulatórios devem estar agindo no controle da expressão destes genes, visto que esta regulação é um evento cooperativo entre inúmeros fatores genéticos e epigenéticos, não limitados à metilação do DNA (BIRD 2002; JONES 2012).

O gene *PAX8-AS1*, com promotor hipermetilado em tumores de pacientes que desenvolveram metástase linfonodal, é um lncRNA mapeado

internamente ao gene *PAX8* (paired box 8), apresentando em nossos dados repressão transcricional nestes tumores. Pela sua natureza e localização, este lncRNA possivelmente está relacionado ao controle *in cis* da expressão do gene *PAX8*. O gene *PAX8* é um fator de transcrição já relacionado ao estado de diferenciação de células foliculares da tireóide e está também associado à capacidade de migração e tumorigênese de células de câncer de ovário (DI PALMA et al. 2014). A verificação do status de metilação da região promotora do lncRNA *PAX8-AS1* em culturas de melanócitos, a partir da base de dados *ENCODE ROADMAP Epigenomics Project* (<http://www.encode-roadmap.org/>), indica hemi-metilação na região, enquanto que o promotor do gene *PAX8* encontra-se desmetilado (**Figura 38**) – tais dados reforçam a alteração do padrão de metilação destas sequências nos melanomas de pacientes com metástase linfonodal em relação a melanócitos. Desta forma, poderíamos postular que a hipermetilação do lncRNA *PAX8-AS1* com consequente diminuição dos níveis de seu transcrito – evidências detectadas em nosso estudo - estaria relacionada com aumento de expressão do gene *PAX8* nos melanomas de pacientes com metástase linfonodal - hipótese a ser averiguada. Ao observarmos as frequências de alterações genéticas dos dois genes (*PAX8* e *PAX8-AS1*) em melanomas cutâneos na base de dados cBioPortal, encontramos uma pequena frequência (6%) de alterações em *PAX8*, principalmente aumento de expressão (**Figura 39**). No entanto, um trabalho avaliou os níveis de expressão proteica de *PAX8* em vários tipos de tecidos neoplásicos, sendo que em melanoma cutâneo a sua expressão foi 100% ausente (TACHA et al. 2011).

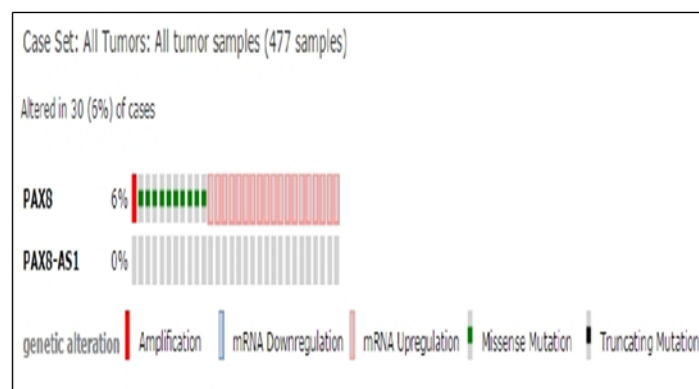


Figura 39 - Panorama de alterações genéticas em 477 melanomas cutâneos do *The Cancer Genome Atlas* afetando genes relacionados com tumores que desenvolveram metástase linfonodal.



Figura 40 - Perfil de metilação do DNA da região genômica 2q13 visualizada através do navegador *UCSC genome browser*, na qual estão localizados os genes *PAX8* e *PAX8-AS1*. Nas linhas superiores, encontram-se os diferentes transcritos do gene *PAX8* e *PAX8-AS1* (DKFZp686E10196). Ilhas CpGs estão marcadas como blocos verdes logo abaixo. A linha marcada em verde-claro representa os dados de sequenciamento de DNA convertido (para análise de metilação de dinucleotídeos CpG). Podemos observar que a região onde se encontra o promotor do gene *PAX8-AS1* apresenta cores amarelas, representativas de hemi-metilação. O promotor do gene *PAX8* (canto direito da figura) encontra-se desmetilado. As últimas linhas representam o *status* de metilação das sondas da plataforma HM450K obtidas a partir de diferentes culturas celulares de pele, principalmente queratinócitos.

O gene *HIST1H1D* codifica a variante da histona de ligação H1.3 e em nosso estudo foi identificado como hipometilado em tumores com mutações em *BRAF*, apresentando aumento de expressão neste grupo tumoral em relação aos melanomas *BRAF*-selvagens com fold de 2,63 vezes. O gene *HIST1H1D* já foi relatado como pouco expresso em osteossarcomas que não super-expressam COX-2 (HAN et al. 2014). Recentemente, a super-expressão da variante H1.3 foi relacionada com menor taxa de crescimento e formação de colônias em células de câncer de ovário (MEDRZYCKI et al. 2014). Não há trabalhos na literatura descrevendo alterações deste gene em melanoma. Entretanto, uma busca na base de dados cBioPortal revelou uma frequência de 6% de alterações genéticas em melanomas cutâneos, principalmente ganho de cópias (amplificação) e aumento de expressão gênica (**Figura 40**).

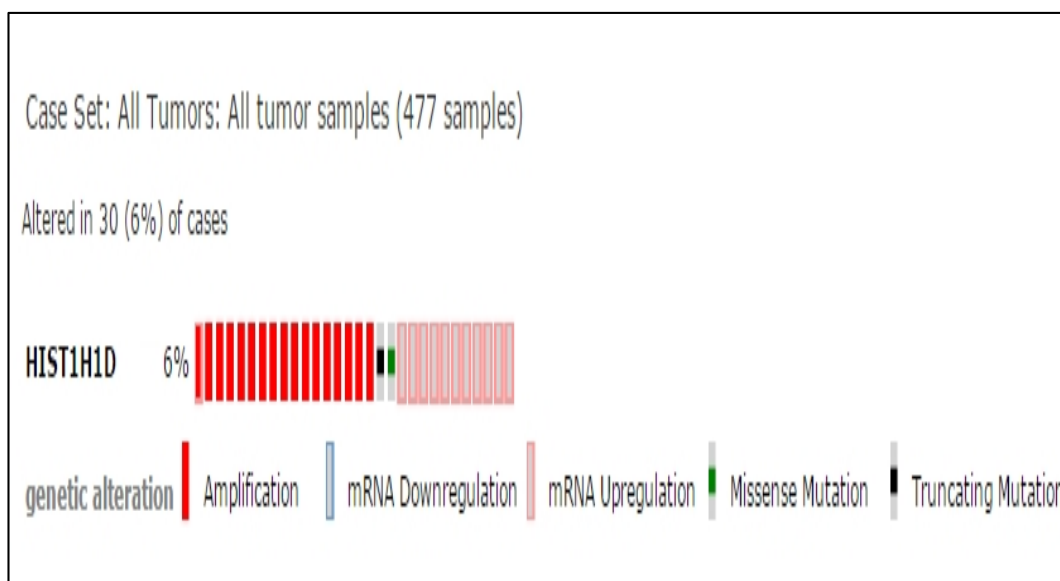


Figura 41 - Panorama de alterações genéticas em 477 melanomas cutâneos do *The Cancer Genome Atlas* afetando o gene *HIST1H1D*, hipometilado em tumores que apresentam mutações em *BRAF*.

5.5 Busca de assinaturas epigenéticas específicas

O trabalho de HOU et al. (2012) em linhagens de melanoma portadoras da mutação $BRAF^{V600E}$ sugere que alterações no metiloma de tais células ocorreriam em decorrência de ativação da via MAP quinase, que por sua vez culmina na hiper-ativação das enzimas *DNMT1* e *EZH2*, elementos efetivos na adição de marcas epigenéticas nas células. De acordo com esta hipótese, a ativação da viaMAP-quinase por outros meios que não a mutação em *BRAF*, como mutações ativadoras em *NRAS* ou *KIT*, deveria portanto exercer efeito semelhante no metiloma de células de melanoma. Desta forma, nós postulamos que este efeito seria detectado pela presença de uma assinatura de genes diferencialmente metilados, independentemente de qual alteração estivesse ativando constitutivamente a via MAP-quinase.

Com o intuito de obter uma assinatura de genes diferencialmente metilados que fosse específica para melanomas portadores de mutações *drivers* na via da MAP-quinase, comparamos tumores portadores de mutações em genes desta via (*BRAF*, *NRAS*, ou *KIT*) com amostras selvagens quanto a esta via (ver Figura 17). Esta análise é diferente da comparação feita entre amostras mutadas contra selvagens para a mesma mutação, pois nesta última muitas vezes estamos comparando conjuntos de tumores nos quais ambos os grupos comparados podem conter amostras com alguma mutação na via MAP-quinase.

Buscamos ainda obter um grau de confiança maior com relação a genes diferencialmente metilados no grupo de tumores com mutações específicas da via MAP-quinase; assim, realizamos a comparação entre tumores mutados na via MAP-quinase e o grupo de melanócitos-controle, para então intersectarmos as duas listas de DMRs. O conjunto de DMRs compartilhadas pelas duas análises seria específico do grupo de tumores portadores de mutações na via MAP-quinase. No entanto, este conjunto de DMRs que seria marcador de mutações na via MAP-quinase apresenta sobreposição praticamente total com o conjunto de DMRs comum a todos os melanomas portadores de quaisquer mutações causais investigadas (*NRAS*, *BRAF*, *TERT*, *CDKN2A*), resultado interpretado aqui como a ausência de uma assinatura específica para a via MAP-quinase (ver Figura 36).

Entretanto, se por um lado este conjunto de intersecções entre diferentes análises revelou a ausência de uma assinatura de metilação de DNA específica para a via MAP-quinase, obtivemos uma assinatura

epigenética independente do *background* mutacional e, portanto, bastante robusta para o melanoma cutâneo, composta por 516 DMRs que correspondem a 516 genes Anexo 2). Esta constatação é corroborada pela sobreposição parcial entre a lista de genes previamente relatados como diferencialmente metilados em associação a características clínico-patológicas e mutacionais no trabalho de ECSEDI et al. (2014) com genes que compõem a assinatura de DMRs constitutivas do melanoma cutâneo identificada em nosso estudo: *EMR3* (egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 3), *MMP14* (matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted), *DCC* *GP1BB* (glycoprotein Ib (platelet), beta polypeptide) (índice de Breslow); *MMP14*, *DCC*, *EMR3* (presença de ulceração); *COL1A2*, *SENP6* (SUMO1/sentrin specific peptidase 6), *GP1BB* (mutação em *BRAF*). Os genes *COL1A2* e *EPHA5* apresentam hipermetilação na região promotora em diversos tumores enquanto que o gene *DCC* é um importante supressor tumoral frequentemente inativado em carcinoma colorretal, como discutido anteriormente (CHO e FEARON 1995; ANDERTON et al. 2008; MORI et al. 2009; FU et al. 2010; BONAZZI et al. 2011; MISAWA et al. 2011-2012; LI et al. 2015). A regulação positiva do gene *EMR3* está relacionada com pior prognóstico em glioblastoma (KANE et al. 2010), enquanto que a expressão do gene *MMP14* está diretamente relacionada com a capacidade migratória de células de melanoma (HONG et al. 2014); outro estudo associou a presença da proteína codificada por *MMP14* com pior prognóstico em melanomas orais (KONDRATIEV et al. 2008). A depleção do gene *SENP6* em linhagens de tumores de fígado, mama e bexiga

implantadas em ratos reduziu o crescimento celular e capacidade invasiva das células (STEFANSKA et al. 2014). Não há estudos na literatura descrevendo o gene *GP1BB* em câncer.

As vias biológicas enriquecidas para esta assinatura de genes diferencialmente metilados também apontam para processos cruciais para o processo de tumorigênese (regulação do desenvolvimento celular) e alterações no padrão de expressão gênica da célula (ligação da RNA pol II a sequências regulatórias e ligações a sequências específicas do DNA).

6 CONCLUSÃO

Detecção de alterações causais no melanoma cutâneo.

Neste estudo, investigamos um painel de alterações causais no melanoma cutâneo com o intuito de utilizar estas informações juntamente com dados clínicos e patológicos e a análise de metilação de DNA. Um dos principais objetivos era investigar a possível existência de uma assinatura de metilação de DNA específica para cada característica investigada.

A detecção de mutações causais nos genes *BRAF*, *NRAS*, *KIT*, *CDKN2A* e *TERT* em nossa coorte revelou frequências mutacionais similares às descritas na literatura. As mutações na via MAP-quinase (*BRAF*, *NRAS*, *KIT*) ocorreram em 60% dos casos e foram mutuamente exclusivas, ao passo que mutações na região promotora do gene *TERT* estiveram associadas na maioria das vezes com mutações em *NRAS* e *BRAF*, como anteriormente relatado. Estudos adicionais são requeridos para verificar uma possível associação entre mutações em *TERT* e *BRAF* ou *NRAS* e um comportamento tumoral mais agressivo.

A presença de deleções e hipermetilação no promotor do gene *CDKN2A* foram frequentes em nossa casuística. Para dois dos tumores primários investigados, detectamos nas metástases pareadas a aquisição de hipermetilação no promotor do gene, corroborando a hipótese de aumento da hipermetilação de *CDKN2A* em tecidos metastáticos. Desta forma, evidencia-se que alterações em *CDKN2A* são eventos importantes no

processo de metastização do melanoma. Essa ideia é reforçada por estudo recente (MARZESE et al. 2014) que foi capaz de separar metástases cerebrais de melanoma em dois grupos de acordo com a presença ou não de alterações em *CDKN2A*; pacientes com deleções em *CDKN2A* geralmente possuíam múltiplas metástases cerebrais.

Avaliação dos níveis de metilação do elemento repetitivo LINE-1.

Das amostras avaliadas quanto aos níveis de metilação do elemento repetitivo LINE-1, cinco apresentaram níveis inferiores a 50%, tendo em comum estadiamento pT4 e presença de alterações no gene *CDKN2A*. A associação entre hipometilação de *LINE-1* e estadiamento avançado do melanoma foi descrita recentemente (HOSHIMOTO et al. 2012), embora não exista ainda na literatura associação entre alteração de metilação no elemento *LINE-1* e mutações no gene *CDKN2A*. Análises posteriores em casuísticas maiores são requeridas para elucidar esta possível associação.

Perfil global de metilação do DNA no melanoma cutâneo.

Inicialmente, realizamos a análise CHAMP na comparação entre melanomas primários e culturas primárias de melanócitos, que revelou um padrão global de metilação do DNA diferenciado, com grande número de regiões intergênicas hipermetiladas, assim como sítios CpGs ao longo do corpo de muitos genes. O efeito do aumento dos níveis de metilação em regiões intergênicas não é conhecido e estudos posteriores são necessários para investigar se estes eventos possuem relevância no surgimento e/ou

progressão do melanoma, e através de que mecanismos este aumento de metilação atuaria no controle transcricional, possivelmente afetando regiões regulatórias como *enhancers*, por exemplo. A metilação no corpo do gene, por sua vez, pode estar associada com a expressão gênica, visto que pode interferir na eficiência da elongação da transcrição (LOU et al. 2014). Desta forma, o grande número de DMRs hipermetiladas no corpo gênico que detectamos em melanomas pode estar relacionado com diferenças nos níveis de expressão de ao menos parte destes genes, contribuindo para o fenótipo tumoral.

Algumas regiões intergênicas hipometiladas e associadas com elementos de transposição e lncRNAs foram encontradas neste estudo, sugerindo uma possível contribuição destes eventos para o fenótipo maligno, visto que a hipometilação em elementos repetitivos está associada com re-ativação e consequente alteração da regulação da expressão de genes próximos (XIE et al. 2013). Desta forma, estudos que abordem os níveis de metilação do DNA para além de promotores gênicos são fundamentais para o completo entendimento do papel deste mecanismo epigenético na melanomagenese, bem como a análise de expressão dos genes relacionados.

Não foram detectadas DMRs entre diferentes subgrupos de melanomas utilizando a abordagem ChAMP. Assim, a utilização de uma pipeline customizada para análise de metilação diferencial foi outra abordagem utilizada neste projeto. Conseguimos estabelecer por meio desta pipeline customizada diversos perfis globais de metilação do DNA, distintos

para cada alteração causal e características clínicas e patológicas. Em última análise, além de obtermos um melhor entendimento do panorama epigenético do melanoma cutâneo, pudemos também apontar subgrupos de melanomas com uma assinatura de hipermetilação global em promotores gênicos (tumores com mutações em *NRAS*, do subtipo histológico acral, e aqueles que apresentam infiltrado inflamatório), que seriam potencialmente mais suscetíveis a tratamento com agentes desmetilantes, por exemplo (YOO e JONES 2006).

Por fim, comparamos a lista de DMRs obtida a partir de análise em subgrupo de tumores portadores de mutações ativadoras da via MAP-quinase com as listas de DMRs em subgrupos portadores de mutações causais não pertencentes a esta via. Constatamos que uma assinatura de DMRs exclusiva para a via MAP-quinase, como foi deduzida a partir do trabalho de HOU et al. (2012), seria inverossímil; tal discrepância poderia ser explicada pelas diferenças intrínsecas entre epigenomas derivados de culturas celulares, como no estudo de Hou, e epigenomas de espécimes frescos, como aqui estudamos. Por outro lado, detectamos no grupo total de melanomas cutâneos uma assinatura epigenética em promotores gênicos, presente independentemente do *background* mutacional dos tumores estudados, sendo desta forma bastante consistente. O aprofundamento no estudo do conjunto de genes que apresenta elementos epigenéticos consistentemente alterados em melanomas cutâneos pode auxiliar no entendimento da biologia tumoral, além de ser um ponto de partida adicional para a busca de terapias que atinjam as vias relacionadas a estes genes.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ackermann J, Frutschi M, Kaloulis K, McKee T, Trumpp A, Beermann F. Metastasizing melanoma formation caused by expression of activated N-RasQ61K on an INK4a-deficient background. **Cancer Res** 2005; 65:4005–11.

Aguiar T PD. Low Frequency of Germline TERT and MITF Mutations in Brazilian Melanoma- Prone Patients. **Hered Genet** 2014; 03:3–4.

Anderton JA, Lindsey JC, Lusher ME, et al. Global analysis of the medulloblastoma epigenome identifies disease-subgroup-specific inactivation of COL1A2. **Neuro Oncol** 2008; 10:981–94.

Bachmann IM, Halvorsen OJ, Collett K, et al. EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast. **J Clin Oncol** 2006; 24:268–73.

Balch CM, Soong SJ, Atkins MB, et al. An Evidence-based Staging System for Cutaneous Melanoma. **CA Cancer J Clin** 2004; 54:131–149.

Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, et al. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. **J Clin Oncol** 2001; 19:3622–34.

Barchitta M, Quattrocchi A, Maugeri A, et al. LINE-1 hypomethylation in blood and tissue samples as an epigenetic marker for cancer risk: a systematic review and meta-analysis. **PLoS One** 2014; 2;9(10):e109478.

Bataille V, Vries EDE. Melanoma — Part 1 : epidemiology , risk factors , and prevention. **BMJ** 2008; 337:a2249.

Bauer J, Büttner P, Murali R, et al. BRAF mutations in cutaneous melanoma are independently associated with age, anatomic site of the primary tumor, and the degree of solar elastosis at the primary tumor site. **Pigment Cell Melanoma Res** 2011; 24:345–51.

Beddingfield FC. The melanoma epidemic: res ipsa loquitur. **Oncologist** 2003; 8:459–65.

Bibikova M, Barnes B, Tsan C, et al. High density DNA methylation array with single CpG site resolution. **Genomics** 2011; 98:288–95.

Bibikova M, Le J, Barnes B, et al. Genome-wide DNA methylation profiling using Infinium® assay. **Epigenomics** 2009; 1:177–200.

Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes Dev** 2002; 16:6–21.

Blomen V A, Boonstra J. Stable transmission of reversible modifications: maintenance of epigenetic information through the cell cycle. **Cell Mol Life Sci** 2011; 68:27–44.

Bonazzi VF, Nancarrow DJ, Stark MS, et al. Cross-platform array screening identifies COL1A2, THBS1, TNFRSF10D and UCHL1 as genes frequently silenced by methylation in melanoma. **PLoS One** 2011; 6:e26121.

Ceol CJ, Houvras Y, Jane-Valbuena J, et al. The histone methyltransferase SETDB1 is recurrently amplified in melanoma and accelerates its onset. **Nature** 2011; 471:513–7.

Cesinaro AM, Schirosi L, Bettelli S, Migaldi M, Maiorana A. Alterations of 9p21 analysed by FISH and MLPA distinguish atypical spitzoid melanocytic tumours from conventional Spitz's nevi but do not predict their biological behaviour. **Histopathology** 2010; 57:515–27.

Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. **N Engl J Med** 2011; 364:2507–16.

Cho KR, Fearon ER. DCC: linking tumour suppressor genes and altered cell surface interactions in cancer? **Eur J Cancer** 1995; 31A:1055–1060.

Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A, Tymińska A. Skin melanocytes: biology and development. **Postepy dermatolo Alergol** 2013; 30:30–41.

Clark WH, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. **Cancer Res** 1969; 29:705–27.

Cress RD, Holly EA. Incidence of cutaneous melanoma among non-Hispanic whites, Hispanics, Asians, and blacks: an analysis of california cancer registry data, 1988-93. **Cancer Causes Control** 1997; 8:246–52.

Curtin J A, Busam K, Pinkel D, Bastian BC. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. **J Clin Oncol** 2006; 24:4340–6.

Damsky WE, Rosenbaum LE, Bosenberg M. Decoding melanoma metastasis. **Cancers** 2010; 3:126–63.

Dankort D, Curley DP, Cartlidge R A, et al. Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. **Nat Genet** 2009; 41:544–52.

Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature** 2002; 417:949–54.

De Araújo ÉSS, Marchi FA, Rodrigues TC, et al. Genome-wide DNA methylation profile of leukocytes from melanoma patients with and without CDKN2A mutations. **Exp Mol Pathol** 2014; 97:425–32.

Dedeurwaerder S, Defrance M, Calonne E, Denis H, Sotiriou C, Fuks F. Evaluation of the Infinium Methylation 450K technology. **Epigenomics** 2011; 3:771–84.

Dhomen N, Reis-Filho JS, Da Rocha Dias S, et al. Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice. **Cancer Cell** 2009; 15:294–303.

Di Palma T, Lucci V, De Cristofaro T, Filippone MG, Zannini M. A role for PAX8 in the tumorigenic phenotype of ovarian cancer cells. **BMC Cancer** 2014; 14:292.

Dutton-Regester K, Hayward NK. Reviewing the somatic genetics of melanoma: from current to future analytical approaches. **Pigment Cell Melanoma Res** 2012; 25:144–54.

Eckhart L, Bach J, Ban J, Tschachler E. Melanin binds reversibly to thermostable DNA polymerase and inhibits its activity. **Biochem Biophys Res Commun** 2000; 271:726–30.

Ecsedi S, Hernandez-Vargas H, Lima SC, et al. DNA methylation characteristics of primary melanomas with distinct biological behaviour. **PLoS One** 2014; 9:e96612.

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. AJCC cancer staging manual. 7^a ed. New York: Springer-Verlag, 2010; Melanoma of the skin; p.325-44.

Ellerhorst J A, Greene VR, Ekmekcioglu S, et al. Clinical correlates of NRAS and BRAF mutations in primary human melanoma. **Clin Cancer Res** 2011; 17:229–35.

Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. **Nat Rev Genet** 2007; 8:286–98.

Felicetti F, Errico MC, Bottero L, et al. The promyelocytic leukemia zinc finger-microRNA-221/-222 pathway controls melanoma progression through multiple oncogenic mechanisms. **Cancer Res** 2008; 68:2745–54.

Fu DY, Wang ZM, Wang BL, et al. Frequent epigenetic inactivation of the receptor tyrosine kinase EphA5 by promoter methylation in human breast cancer. **Hum Pathol** 2010; 41:48–58.

Furano AV. The biological properties and evolutionary dynamics of mammalian LINE-1 retrotransposons. **Prog Nucleic Acid Res Mol Biol** 2000; 64:255-94.

Füllgrabe J, Kavanagh E, Joseph B. Histone onco-modifications. **Oncogene** 2011; 30:3391–403.

Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. **Eur J Cancer** 2005; 41:45–60.

Gao L, Smit M A, Van den Oord JJ, et al. Genome-wide promoter methylation analysis identifies epigenetic silencing of MAPK13 in primary cutaneous melanoma. **Pigment Cell Melanoma Res** 2013; 26:542–54.

Garraway L A, Widlund HR, Rubin M A, et al. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. **Nature** 2005; 436:117–22.

Gaziel-Sovran A, Segura MF, Di Micco R, et al. miR-30b/30d regulation of GalNAc transferases enhances invasion and immunosuppression during metastasis. **Cancer Cell** 2011; 20:104–18.

Ghildiyal M, Zamore PD. Small silencing RNAs: an expanding universe. **Nat Rev Genet** 2009; 10:94–108.

Greenberg ES, Chong KK, Huynh KT, Tanaka R, Hoon DSB. Epigenetic biomarkers in skin cancer. **Cancer Lett** 2014; 342:170–7.

Grichnik JM, Burch J A, Schulteis RD, et al. Melanoma, a tumor based on a mutant stem cell? **J Invest Dermatol** 2006; 126:142–53.

Guo J, Si L, Kong Y, et al. Phase II, open-label, single-arm trial of imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma harboring c-Kit mutation or amplification. **J Clin Oncol** 2011; 29:2904–9.

Han JA, Kim JY, Kim JI. Analysis of gene expression in cyclooxygenase-2-overexpressed human osteosarcoma cell lines. **Genomics Inform** 2014; 12:247–53.

Handolias D, Salemi R, Murray W, et al. Mutations in KIT occur at low frequency in melanomas arising from anatomical sites associated with chronic and intermittent sun exposure. **Pigment Cell Melanoma Res** 2010; 23:210–5.

Harrison SL, MacKie RM, MacLennan R. Development of melanocytic nevi in the first three years of life. **J Natl Cancer Inst** 2000; 92:1436–8.

Heidenreich B, Nagore E, Rachakonda PS, et al. Telomerase reverse transcriptase promoter mutations in primary cutaneous melanoma. **Nat Commun** 2014; 5:3401.

Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, et al. A landscape of driver mutations in melanoma. **Cell** 2012; 150:251–63.

Hoerter JD, Bradley P, Casillas A, et al. Does melanoma begin in a melanocyte stem cell? **J Skin Cancer** 2012a; 2012:571087.

Hoerter JD, Bradley P, Casillas A, et al. Extrafollicular dermal melanocyte stem cells and melanoma. **Stem Cells Int** 2012b; 2012:407079.

Hoivik EA, Kusonmano K, Halle MK, et al. Hypomethylation of the CTCFL/BORIS promoter and aberrant expression during endometrial cancer progression suggests a role as an Epi-driver gene. **Oncotarget** 2014; 5:1052–61.

Hong IK, Byun HJ, Lee J, et al. The tetraspanin CD81 protein increases melanoma cell motility by up-regulating metalloproteinase MT1-MMP expression through the pro-oncogenic Akt-dependent Sp1 activation signaling pathways. **J Biol Chem** 2014; 289:15691–704.

Hoon DSB, Spugnardi M, Kuo C, Huang SK, Morton DL, Taback B. Profiling epigenetic inactivation of tumor suppressor genes in tumors and plasma from cutaneous melanoma patients. **Oncogene** 2004; 23:4014–22.

Horn S, Figl A, Rachakonda PS, et al. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. **Science** 2013; 339:959–61.

Hoshimoto S, Kuo CT, Chong KK, et al. AIM1 and LINE-1 epigenetic aberrations in tumor and serum relate to melanoma progression and disease outcome. **J Invest Dermatol** 2012; 132:1689–97.

Hosler GA, Davoli T, Mender I, et al. A primary melanoma and its asynchronous metastasis highlight the role of BRAF, CDKN2A, and TERT. **J Cutan Pathol** 2015; 42:108-17.

Hou P, Liu D, Dong J, Xing M. The BRAF(V600E) causes widespread alterations in gene methylation in the genome of melanoma cells. **Cell Cycle** 2012; 11:286–95.

Huang FW, Hodis E, Xu MJ, Kryukov GV, Chin L, Garraway LA. Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. **Science** 2013; 339:957–9.

Hyland PL, Burke LS, Pfeiffer RM et al. LINE-1 methylation in peripheral blood and the risk of melanoma in melanoma-prone families with and without CDKN2A mutations. **Melanoma Res** 2013; 23(1):55-60.

ILLUMINA. **Infinium HumanMethylation450 BeadChip Kit**. Available from: <URL:http://www.illumina.com/products/methylation_450_beadchip_kits.ilm> [2014 fev 2).

ILLUMINA. **Infinium Methylation Assay**. Available form: <URL:<http://www.illumina.com/technology/beadarray-technology/infinium-methylation-assay.html>> [2015 jan 11].

Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. **Nat Rev Genet** 2012; 13:484–92.

Jonsson A, Tuominen R, Grafström E, Hansson J, Egyhazi S. High frequency of p16(INK4A) promoter methylation in NRAS-mutated cutaneous melanoma. **J Invest Dermatol** 2010; 130:2809–17.

Kane AJ, Sughrue ME, Rutkowski MJ, Phillips JJ, Parsa AT. EMR-3: a potential mediator of invasive phenotypic variation in glioblastoma and novel therapeutic target. **Neuroreport** 2010; 21:1018–22.

Kawakami A, Fisher DE. Key discoveries in melanocyte development. **J Invest Dermatol** 2011; 131:E2–4.

Ko SY, Naora H. HOXA9 promotes homotypic and heterotypic cell interactions that facilitate ovarian cancer dissemination via its induction of P-cadherin. **Mol Cancer** 2014; 13:170.

Koh J, Enders GH, Dynlacht BD, Harlow E. Tumour-derived p16 alleles encoding proteins defective in cell-cycle inhibition. **Nature** 1995; 375:506–10.

Kondratiev S, Gnepp DR, Yakirevich E, et al. Expression and prognostic role of MMP2, MMP9, MMP13, and MMP14 matrix metalloproteinases in sinonasal and oral malignant melanomas. **Hum Pathol** 2008; 39:337–43.

Kostaki M, Manona AD, Stavraka I, et al. High-frequency p16(INK) (4A) promoter methylation is associated with histone methyltransferase SETDB1 expression in sporadic cutaneous melanoma. **Exp Dermatol** 2014; 23:332–8.

Kyrgidis A, Tzellos TG, Triaridis S. Melanoma: Stem cells, sun exposure and hallmarks for carcinogenesis, molecular concepts and future clinical implications. **J Carcinog** 2010; 9:3.

Li S, Zhu Y, Ma C, et al. Downregulation of EphA5 by promoter methylation in human prostate cancer. **BMC Cancer** 2015; 15:18.

Liao YP, Chen LY, Huang RL, et al. Hypomethylation signature of tumor-initiating cells predicts poor prognosis of ovarian cancer patients. **Hum Mol Genet** 2014; 23:1894–906.

Lindqvist BM, Wingren S, Motlagh PB, Nilsson TK. Whole genome DNA methylation signature of HER2-positive breast cancer. **Epigenetics** 2014; 9:1149–62.

Liu J, Liu J, Song B, et al. Genetic variations in CTLA-4, TNF- α , and LTA and susceptibility to T-cell lymphoma in a Chinese population. **Cancer Epidemiol** 2013; 37:930–4.

Lou S, Lee H-M, Qin H, et al. Whole-genome bisulfite sequencing of multiple individuals reveals complementary roles of promoter and gene body methylation in transcriptional regulation. **Genome Biol** 2014; 15:408.

[MMMP] Melanoma Molecular Map Project. **Premise**. Available from: <URL:<http://www.mmmp.org/MMMP/import.mmmp?page=overview.mmmp>> [2013a dez 12]

[MMMP] Melanoma Molecular Map Project. **Risk factors**. Available from: <URL:<http://www.mmmp.org/MMMP/import.mmmp?page=riskfactors.mmmp>> [2013b dez 12]

Macgregor S, Montgomery GW, Liu JZ, et al. Genome-wide association study identifies a new melanoma susceptibility locus at 1q21.3. **Nat Genet** 2011; 43:1114–8.

Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. **Nat Rev Cancer** 2003; 3:459–65.

Marabita F, Almgren M, Lindholm ME, et al. An evaluation of analysis pipelines for DNA methylation profiling using the Illumina HumanMethylation450 BeadChip platform. **Epigenetics** 2013; 8:333–46.

Martinez-Garcia E, Licht JD. Deregulation of H3K27 methylation in cancer. **Nat Genet** 2010; 42:100–1.

Marzese DM, Scolyer RA, Roqué M, et al. DNA methylation and gene deletion analysis of brain metastases in melanoma patients identifies mutually exclusive molecular alterations. **Neuro Oncol** 2014; 16:1499–509.

Medrzycki M, Zhang Y, Zhang W, et al. Histone h1.3 suppresses h19 noncoding RNA expression and cell growth of ovarian cancer cells. **Cancer Res** 2014; 74:6463–73.

Merritt WM, Lin YG, Han LY, et al. Dicer, Drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer. **N Engl J Med** 2008; 359:2641–50.

Milagre C, Dhomen N, Geyer FC, et al. A mouse model of melanoma driven by oncogenic KRAS. **Cancer Res** 2010; 70:5549–57.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2014.

Misawa K, Kanazawa T, Misawa Y, et al. Hypermethylation of collagen $\alpha 2$ (I) gene (COL1A2) is an independent predictor of survival in head and neck cancer. **Cancer Biomark** 2011-2012; 10:135-44.

Mori K, Enokida H, Kagara I, et al. CpG hypermethylation of collagen type I alpha 2 contributes to proliferation and migration activity of human bladder cancer. **Int J Oncol** 2009; 34:1593–602.

Morris TJ, Butcher LM, Feber A, et al. ChAMP: 450k Chip Analysis Methylation Pipeline. **Bioinformatics** 2014; 30:428–30.

Murayama A, Sakura K, Nakama M, et al. A specific CpG site demethylation in the human interleukin 2 gene promoter is an epigenetic memory. **EMBO J** 2006; 25:1081–92.

Nestor CE, Ottaviano R, Reinhardt D, et al. Rapid reprogramming of epigenetic and transcriptional profiles in mammalian culture systems. **Genome Biol** 2015; 16:11.

Oble DA, Loewe R, Yu P, Mihm MC. Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human melanoma. **Cancer Immun** 2009; 9:3.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res** 2001; 29:45e–45.

Piliang MP. Acral lentiginous melanoma. **Clin Lab Med** 2011; 31:281–8.

Raimondi S, Sera F, Gandini S, et al. MC1R variants, melanoma and red hair color phenotype: a meta-analysis. **Int J Cancer** 2008; 122:2753–60.

Rigel DS, Carucci JA. Malignant melanoma: prevention, early detection, and treatment in the 21st century. **CA Cancer J Clin** 2000; 50:215–36; quiz 237–40.

Riker AI, Zea N, Trinh T. The epidemiology, prevention, and detection of melanoma. **Ochsner J** 2010; 10:56–65.

Robertson-Tessi M, Anderson AR. Big Bang and context-driven collapse. **Nat Publ Gr** 2015; 47:196–7.

Saldanha G, Purnell D, Fletcher A, Potter L, Gillies A, Pringle JH. High BRAF mutation frequency does not characterize all melanocytic tumor types. **Int J Cancer** 2004; 111:705–10.

Sandoval J, Heyn HA, Moran S, et al. Validation of a DNA methylation microarray for 450,000 CpG sites in the human genome. **Epigenetics** 2011; 6:692–702.

Shen J, Wang S, Zhang YJ, et al. Exploring genome-wide DNA methylation profiles altered in hepatocellular carcinoma using Infinium HumanMethylation 450 BeadChips. **Epigenetics** 2013; 8:34–43.

Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. **CA Cancer J Clin** 2014; 64:9–29.

Silva JH, Sá BC, Avila AL, Landman G, Duprat Neto JP. Atypical mole syndrome and dysplastic nevi: identification of populations at risk for developing melanoma - review article. **Clinics (Sao Paulo)**. 2011; 66:493-9.

Smalley KSM. Understanding melanoma signaling networks as the basis for molecular targeted therapy. **J Invest Dermatol** 2010; 130:28–37.

Smyth GK. **Limma: linear models for Microarray Data**. In: Bioinforma Comput Biol Solut Using R Bioconductor. p.397–420. Disponível em: <URL:<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/limma.html>> [2015 jan 20]

Stefanska B, Cheishvili D, Suderman M, et al. Genome-wide study of hypomethylated and induced genes in patients with liver cancer unravels novel anticancer targets. **Clin Cancer Res** 2014; 20:3118–32.

Taby R, Issa JJ. Cancer epigenetics. **CA Cancer J Clin** 2010; 60:376–92.

Tacha D, Zhou D, Cheng L. Expression of PAX8 in normal and neoplastic tissues: a comprehensive immunohistochemical study. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2011; 19:293–9.

Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2002; 99:3740–5.

Tanemura A, Terando AM, Sim MS, et al. CpG island methylator phenotype predicts progression of malignant melanoma. **Clin Cancer Res** 2009; 15:1801–7.

Thomas NE, Slater NA, Edmiston SN, et al. DNA-methylation Profiles in Primary Cutaneous Melanomas are Associated with Clinically Significant Pathologic Features. **Pigment Cell Melanoma Res** 2014; 27:1097-105.

Torrezan GT, Ferreira EN, Nakahata AM, et al. Recurrent somatic mutation in DROSHA induces microRNA profile changes in Wilms tumour. **Nat Commun** 2014; 5:4039.

Tsao H, Chin L, Garraway LA, Fisher DE. Melanoma: from mutations to medicine. **Genes Dev** 2012; 26:1131–55.

Uchida K, Veeramachaneni R, Huey B, Bhattacharya A, Schmidt BL, Albertson DG. Investigation of HOXA9 promoter methylation as a biomarker to distinguish oral cancer patients at low risk of neck metastasis. **BMC Cancer** 2014; 14:353.

VanBrocklin MW, Robinson JP, Lastwika KJ, Khoury JD, Holmen SL. Targeted delivery of NRASQ61R and Cre-recombinase to post-natal melanocytes induces melanoma in Ink4a/Arflox/lox mice. **Pigment Cell Melanoma Res** 2010; 23:531–41.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol** 2002; 3:RESEARCH0034.

Varada S, Mahalingam M. Mutation stability in primary and metastatic melanoma: what we know and what we don't. **Histol Histopathol** 2015 Jan 13.

Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. **Science** 2013; 339:1546–58.

Volkovova K, Bilanicova D, Bartonova A, Letašiová S, Dusinska M. Associations between environmental factors and incidence of cutaneous melanoma. Review. **Environ Health** 2012; 11 Suppl 1:S12.

Wang HT, Choi B, Tang M. Melanocytes are deficient in repair of oxidative DNA damage and UV-induced photoproducts. **Proc Natl Acad Sci USA** 2010; 107:12180–5.

Wang J, Duncan D, Shi Z, Zhang B. WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt): update 2013. **Nucleic Acids Res** 2013; 41:W77–83.

Wu MC, Joubert BR, Kuan P, et al. A systematic assessment of normalization approaches for the Infinium 450K methylation platform. **Epigenetics** 2014; 9:318–29.

Xie M, Hong C, Zhang B, et al. DNA hypomethylation within specific transposable element families associates with tissue-specific enhancer landscape. **Nat Genet** 2013; 45:836–41.

Yamazaki N, Tanaka R, Tsutsumida A, et al. BRAF V600 mutations and pathological features in Japanese melanoma patients. **Melanoma Res** 2015; 25:9–14.

Yokoyama S, Woods SL, Boyle GM, et al. A novel recurrent mutation in MITF predisposes to familial and sporadic melanoma. **Nature** 2011; 480:99–103.

Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. **Nat Rev Drug Discov** 2006; 5:37–50.

Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. **Cell** 1998; 92:725–34.

Anexo 1- Aprovação do comitê de ética da instituição



**A.C. Camargo
Cancer Center**

**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 05 de junho de 2013.

A

Dra. Ana Cristina Victorino Krepischi.

Aluno: Dimitrius Tansini Pramio (Mestrado).

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1765/13

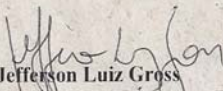
“Investigação do perfil mutacional em melanomas cutâneos e impacto no padrão global de metilação do DNA”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 07/05/2013, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 09/04/2013, **aprovaram** a realização do projeto do estudo em referência (datado de 05 de março de 2013) e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração Sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre o Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Câncer de Pele e Dermatologia;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Centro Internacional de Pesquisa e Ensino (CIPE);
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Biobanco;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração Sobre a Publicação dos Dados de Pesquisa Utilizando Amostras Fornecidas e Processadas pelo Biobanco do Hospital AC Camargo;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Centro Internacional de Pesquisa e Ensino (CIPE);
- Orçamento Financeiro Detalhado.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,


Dr. Jefferson Luiz Gross

1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

Anexo 2- Lista dos 516 genes diferencialmente metilados independentemente do *background* mutacional de melanomas cutâneos primários.

CST7	CA14	DLGAP2	GNA14	HPSE2	LOC146880	MPZL2
ACP5	CABLES1	DMGDH	GNMT	HSPB6	LOC200726	MSC
ACSBG1	CABYR	DMRTA2	GP1BB	IGFBP3	LOC254559	MSX1
ACSF2	CACNA1H	DNAH10	GP6	IL1RN	LOC284688	MT3
ACTA1	CARD11	DNAJA4	GPR133	IL21R	LOC285370	MTMR7
AGAP2	CASC15	DNALI1	GPR25	INSRR	LOC285796	MUC2
AIM2	CASS4	DPP6	GPR31	IRF6	LOC286002	MUC5B
AKR7A3	CBLN4	DPY19L2P2	GPR6	IRX2	LOC400931	MUC6
AKR7L	CCDC140	DRC1	GPR75	ISL2	LOC401463	MYF5
ALDH1L1	CCDC163P	DRD4	GRAMD1B	ITGBL1	LOC440461	MYO16
ALDH2	CCDC19	DYSF	GRAMD2	IZUMO1	LOC440839	MYT1L
ALOX12	CCL23	ECEL1P2	GRHL2	JAKMIP3	LOC648691	NAGS
ALX4	CD300LG	EFCAB1	GRM1	JPH4	LOC90834	NAV1
ANGPT2	CD302	EID3	GSTO2	KCNA4	LOXL1	NBEA
ANGPT4	CD79B	ELFN1	HAAO	KCNAB2	LRRN4CL	NKAPL
ANKRD30A	CDH19	ELTD1	HCG4	KCNAB3	LTF	NKX2-2
AOX1	CDKL2	EMR3	HIST1H1A	KCNC2	LZTS1	NKX2-5
APC2	CFTR	EN1	HIST1H2AE	KCNE4	MAB21L1	NKX2-8
AQPEP	CHAD	ENTPD3	HIST1H2AJ	KCNQ1DN	MACC1	NLRP12
ARHGAP15	CHI3L1	EPHX3	HIST1H2BB	KCNQ2	MBP	NME5
ARHGAP25	CHN2	ESPN	HIST1H2BE	KIAA0930	MEF2B	NPAP1
ARHGAP27	CIDEA	ESPNP	HIST1H2BG	KIAA1751	MEOX2	NR2E1
ARHGDB	CLDN11	ESRP1	HIST1H2BH	KIF26A	MFSD6L	NRIP2
ASZ1	CLDN6	EVX1	HIST1H2BI	KLHDC7B	MGC12916	OLIG1
AURKC	CLDN9	EVX2	HIST1H2BM	KLHL6	MGC16025	OLIG2
B3GALT4	CLIC6	EXOC3L2	HIST1H3E	KNDC1	MGC45800	OLIG3
BARHL2	CMYA5	FADS2	HIST1H3F	KRT7	MIR10A	OR12D2
BCL9L	CNTN1	FAM13A	HIST1H3G	KRT9	MIR1247	OR14J1
BEND7	CNTNAP5	FAM183A	HIST1H3I	KRTCAP3	MIR125B1	OR9Q1
BEST1	COL11A1	FAM49A	HIST1H4F	LAIR1	MIR127	OSM
BIN2	COL12A1	FERD3L	HIST1H4L	LCAT	MIR149	OSR1
BNC1	COL14A1	FES	HIST2H2BA	LCP2	MIR153-2	OSR2
C10orf107	COL1A2	FLJ42709	HIST2H2BF	LCTL	MIR155HG	OTP
C10orf108	COL24A1	FLJ42875	HKR1	LGALS3BP	MIR24-1	P2RX6
C11orf88	COL7A1	FLRT2	HLA-DPB1	LHX1	MIR323B	PAPL
C14orf23	CPT1B	FOXG1	HLA-G	LHX2	MIR329-1	PARVG
C14orf39	CPT1C	FOXL2	HLA-H	LHX6	MIR365A	PAX6
C15orf26	CTXN2	FRZB	HLA-J	LHX8	MIR485	PAX9
C15orf60	CXCL10	GALNT3	HLF	LILRA4	MIR487B	PCDH17
C17orf107	CYGB	GATA4	HORMAD2	LILRB2	MIR539	PCDHGA1
C19orf59	CYP1B1	GBX2	HOXA11	LINC00304	MIR548F5	PCDHGA10
C19orf71	CYP26C1	GCM2	HOXA11-AS	LINC00336	MIR596	PCDHGA2
C1orf194	CYTIP	GCNT2	HOXA4	LINC00346	MIR641	PCDHGA3
C22orf45	DAO	GCSAML	HOXA7	LINC00588	MIR656	PCDHGA4
C2orf40	DCC	GFI1	HOXA9	LOC100127888	MIR663A	PCDHGA5
C2orf70	DCDC2	GIMAP7	HOXB2	LOC100130776	MIR758	PCDHGA6
C3orf15	DDN	GIMAP8	HOXD10	LOC100132707	MLNR	PCDHGA7
C3orf72	DENND1C	GJC2	HOXD12	LOC100270710	MMACHC	PCDHGA9
C5orf38	DDK3	GLIPR1L1	HOXD3	LOC144571	MMP14	PCDHGB1
C5orf52	DLEU7	GLRA1	HOXD4	LOC145845	MMP23B	PCDHGB2
PCDHGB3	S1PR4	TAGLN3	ZAR1			

PCDHGB4	SALL4	TAL1	ZIC1
PCDHGB5	SATB2-AS1	TBC1D10C	ZIC4
PCDHGB6	SBF1P1	TBC1D16	ZIC5
PCDHGC4	SDPR	TBR1	ZNF154
PCED1B	SEC31B	TBX1	ZNF192P1
PCSK9	SERHL	TBX15	ZNF300P1
PDE4D	SFRP1	TBX5	ZNF35
PHKG1	SFRP2	TCTEX1D1	ZNF385A
PHOX2B	SFTA3	TEKT3	ZNF418
PIEZO2	SGIP1	TENC1	ZNF577
PIPOX	SHE	TFAP2A	ZNF814
PITX2	SIM1	TFPI2	ZNF876P
PLCD4	SIM2	THBD	ZNRD1-AS1
PLOD2	SIX6	TIMP4	
POM121L12	SKOR1	TKTL2	
PON3	SLAMF1	TLX1	
PPP1R2P1	SLC12A8	TLX1NB	
PPP1R3C	SLC17A7	TLX2	
PRAME	SLC24A5	TLX3	
PRDM13	SLC25A2	TM4SF19	
PRDM14	SLC26A10	TMEM196	
PRDM8	SLC27A3	TMEM204	
PRKD3	SLC38A4	TMPRSS5	
PRLHR	SLC43A3	TP53INP1	
PROCA1	SLC7A4	TPO	
PRR15	SLC7A8	TRAF3IP3	
PRRT1	SLFN13	TRERF1	
PTCHD4	SLITRK3	TRIL	
PTPN6	SNAR-B1	TRIM2	
PTPRN2	SNAR-B2	TRIM59	
RAB17	SNORD115-10	TRIM63	
RARA	SNORD115-41	TRPM1	
RARB	SNORD123	TSPAN19	
RASAL3	SNORD1A	TSSK3	
RASEF	SNX31	TTC22	
RBFOX1	SOX1	TUBA3FP	
RBFOX3	SOX10	TWIST1	
REC8	SOX2	TWIST2	
RGR	SOX2-OT	TXNRD1	
RGS12	SP9	UCN	
RHOH	SPAG6	UCP1	
RLTPR	SPINT2	UNC5D	
RNF207	SPN	UPB1	
RNF220	SPON2	UPK3A	
RNF39	SPP1	VAX1	
RSPH9	STAP2	VSX1	
RTL1	SYN2	WDFY4	
S100A1	SYNC	WNK4	
S100A4	TAGLN	WRAP73	